

促红细胞生成素及受体信号通路调控牙周膜干细胞成骨分化的机制

孙 峥, 赵 华

<https://doi.org/10.12307/2025.561>

投稿日期: 2024-06-14

采用日期: 2024-09-21

修回日期: 2024-11-11

在线日期: 2024-11-26

中图分类号:

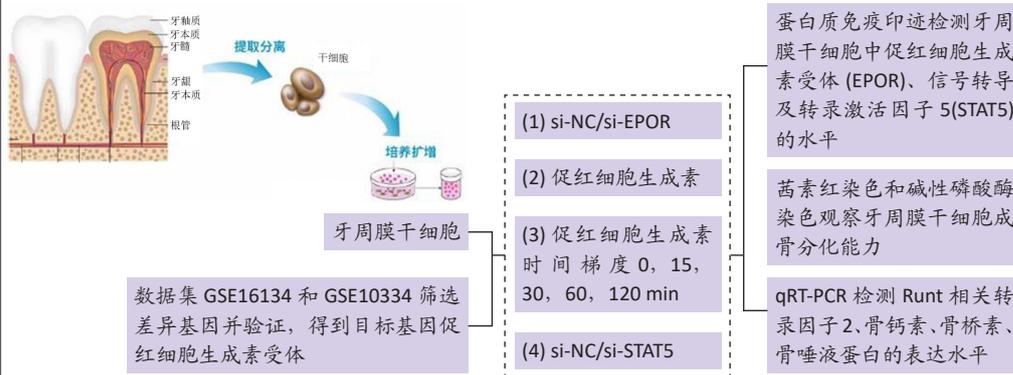
R459.9; R318; R68

文章编号:

2095-4344(2025)36-07762-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 促红细胞生成素/促红细胞生成素受体信号通路对牙周膜干细胞成骨分化的影响



文题释义:

促红细胞生成素受体: 是 I 型细胞因子受体家族的成员, 表达于红系祖细胞表面, 其配体促红细胞生成素是一种由肾脏分泌的 N-连接糖蛋白激素。近年来研究发现, 促红细胞生成素/促红细胞生成素受体信号通路也参与调节非造血组织, 如脑、心脏、骨骼肌、脂肪组织等的代谢反应。

牙周膜干细胞: 牙周膜是一种紧密的纤维结缔组织, 连接牙根和周围的牙槽骨, 其中含有组织特异性干细胞, 即牙周膜干细胞, 在牙周膜、牙骨质和牙槽骨的微环境调节和组织稳态中发挥积极作用。

摘要

背景: 促红细胞生成素/促红细胞生成素受体信号通路除了参与骨髓造血, 也参与调节非造血组织, 如脑、心脏、骨骼肌、脂肪组织等的代谢反应。同时, 激活此信号通路能加速牙周膜干细胞的生物矿化过程, 减轻细胞氧化应激损伤, 但促进牙周膜干细胞成骨分化的机制尚不清楚。

目的: 探究促红细胞生成素/促红细胞生成素受体信号通路对牙周膜干细胞成骨分化的影响及作用机制。

方法: 采用酶消化法分离、培养牙周疾病患者及健康人群的牙周膜干细胞, 采用 qRT-PCR 和免疫印迹法检测两种牙周膜干细胞中促红细胞生成素受体的 mRNA 和蛋白表达水平。使用小干扰 RNA 沉默促红细胞生成素受体, 或使用促红细胞生成素诱导促红细胞生成素受体表达激活, 然后采用 qRT-PCR、免疫印迹法检测促红细胞生成素受体、成骨标志基因 Runt 相关转录因子 2、骨钙素、骨桥素、骨唾液蛋白的表达水平, 采用碱性磷酸酶染色、茜素红染色检测牙周膜干细胞成骨分化能力, 采用免疫印迹法检测信号转导及转录激活因子 5 的磷酸化水平。

结果与结论: ① qRT-PCR 和免疫印迹法结果显示, 疾病组牙周膜干细胞中促红细胞生成素受体的 mRNA 和蛋白水平显著低于健康组牙周膜干细胞; ② 碱性磷酸酶染色以及茜素红染色显示, 敲低促红细胞生成素受体能抑制牙周膜干细胞的成骨分化能力; qRT-PCR 结果显示, 与对照组相比, 敲低促红细胞生成素受体组 Runt 相关转录因子 2、骨钙素、骨桥素和骨唾液蛋白的表达水平显著降低 ($P < 0.05$); ③ qRT-PCR 结果显示, 促红细胞生成素处理后, 牙周膜干细胞中促红细胞生成素受体表达恢复, 沉默促红细胞生成素受体后再给予促红细胞生成素处理, 逆转了促红细胞生成素受体的表达水平; 促红细胞生成素处理后提高了疾病组牙周膜干细胞的成骨分化能力以及成骨标志基因 Runt 相关转录因子 2 的表达水平 ($P < 0.05$), 沉默信号转导及转录激活因子 5 表达后, 抑制了促红细胞生成素的这种作用; ④ 免疫印迹结果显示, 随着促红细胞生成素处理时间的延长, 疾病组牙周膜干细胞中信号转导及转录激活因子 5 磷酸化水平增加 ($P < 0.05$)。上述结果表明, 促红细胞生成素通过诱导信号转导及转录激活因子 5 的磷酸化, 恢复病理性牙周膜干细胞的成骨分化能力。

关键词: 牙周膜干细胞; 促红细胞生成素; 促红细胞生成素受体; 信号转导及转录激活因子 5; 成骨分化; 牙周炎; 工程化干细胞

Mechanism of erythropoietin/erythropoietin receptor signaling pathway in regulating osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells

Sun Zheng, Zhao Hua

Department of Stomatology, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, Shanxi Province, China

Sun Zheng, Associate chief physician, Department of Stomatology, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, Shanxi Province, China

山西医科大学第二医院口腔科, 山西省太原市 030000

第一作者: 孙峥, 女, 1973 年生, 吉林省长春市人, 汉族, 副主任医师, 主要从事口腔颌面外科, 牙及牙槽外科方向研究。

<https://orcid.org/0009-0005-9295-8455> (孙峥)

基金资助: 山西省重点研发计划项目 (201903D321141), 项目负责人: 孙峥; 山西省卫生健康委科研课题项目, 项目负责人: 孙峥

引用本文: 孙峥, 赵华. 促红细胞生成素及受体信号通路调控牙周膜干细胞成骨分化的机制 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(36):7762-7768.



Abstract

BACKGROUND: Erythropoietin/erythropoietin receptor signaling pathway not only participates in bone marrow hematopoiesis, but also regulates the metabolic response of non-hematopoietic tissues, such as brain, heart, skeletal muscle, and adipose tissue. Simultaneously, it can accelerate the mineralization process of periodontal ligament stem cells and reduce oxidative stress damage. However, the mechanism of action on osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells is still unclear.

OBJECTIVE: To investigate the effect and action mechanism of erythropoietin/erythropoietin receptor signaling pathway on osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells.

METHODS: Enzyme digestion method was used to isolate and culture periodontal ligament stem cells from periodontal disease patients and healthy people. The mRNA and protein levels of erythropoietin receptor in two kinds of periodontal ligament stem cells were detected by qRT-PCR and western blot assay. Erythropoietin receptor expression was silenced by small interfering RNA (siRNA) or activated by erythropoietin. qRT-PCR and western blot assay were used to detect the expression of erythropoietin receptor, levels of osteogenic marker genes Runt-related transcription factor 2 (Runx2), osteocalcin, osteopontin, and bone sialoprotein. Alkaline phosphatase staining and alizarin red staining were applied to measure osteogenic differentiation ability of periodontal ligament stem cells. The phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) was detected by western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The results of qRT-PCR and western blot assay showed that the mRNA and protein levels of erythropoietin receptor in periodontal ligament stem cells in the disease group were significantly lower than those in periodontal ligament stem cells in the healthy group. (2) Alkaline phosphatase staining and alizarin red staining showed that knocking down the erythropoietin receptor can inhibit the osteogenic differentiation ability of periodontal ligament stem cells. qRT-PCR results showed that compared with the control group, knockdown of the erythropoietin receptor group significantly reduced expression levels of Runt-related transcription factor 2, osteocalcin, osteopontin, and bone sialoprotein ($P < 0.05$). (3) qRT-PCR results showed that after erythropoietin treatment, the expression of erythropoietin receptor in periodontal ligament stem cells recovered. Silencing erythropoietin receptor and then administration of erythropoietin treatment reversed the expression level of erythropoietin receptor. Erythropoietin treatment increased the osteogenic differentiation ability of periodontal ligament stem cells in the disease group and the expression level of the osteogenic marker gene Runt-related transcription factor 2 ($P < 0.05$). Silencing the expression of STAT5 inhibited this effect of erythropoietin. (4) Western blot assay results showed that with the extension of erythropoietin treatment time, the phosphorylation level of STAT5 increased in periodontal ligament stem cells in the disease group ($P < 0.05$). The above results indicate that erythropoietin restores the osteogenic differentiation ability of pathological periodontal ligament stem cells by inducing the phosphorylation of STAT5.

Key words: periodontal ligament stem cell; erythropoietin; erythropoietin receptor; signal transducer and activator of transcription 5; osteogenic differentiation; periodontitis; engineered stem cells

Funding: Shanxi Provincial Key Research & Development Project, No. 201903D321141 (to SZ); Shanxi Provincial Health Commission Research Project (to SZ)

How to cite this article: SUN Z, ZHAO H. Mechanism of erythropoietin/erythropoietin receptor signaling pathway in regulating osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(36):7762-7768.

0 引言 Introduction

牙周炎是一种常见的牙齿支持组织的感染性疾病，如不及时治疗会导致牙齿松动、脱落，甚至颌骨骨质破坏^[1-3]。常用的治疗方法如物理治疗、牙周手术等效果不佳，因此，组织再生以及利用干细胞重建牙周组织和骨组织成为近年来的主要研究方向^[4]。牙周膜是一种紧密的纤维结缔组织，连接牙根和周围的牙槽骨，其中含有组织特异性干细胞，即牙周膜干细胞^[5-7]。牙周膜干细胞在牙周膜、牙骨质和牙槽骨的微环境调节和组织稳态中发挥积极作用^[8]。

促红细胞生成素受体 (erythropoietin receptor, EPOR) 是 I 型细胞因子受体家族的成员，表达于红系祖细胞表面^[9-11]，其配体促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 是一种由肾脏分泌的 N-连接糖蛋白激素，可作用于红系祖细胞，并介导促红细胞生成素受体 / Janus 激酶 / 信号转导及转录激活因子 5 (signal transducer and activator of transcription 5, STAT5) 通路的激活，从而促进骨髓造血^[12-13]。近年来研究发现，促红细胞生成素 / 促红细胞生成素受体信号通路也参与调节非造血组织，如脑、心脏、骨骼肌、脂肪组织等的代谢反应^[14-16]。ZHENG 等^[17-18]报道了促红细胞生成素通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路加速体外牙周膜干细胞的生物矿化过程；给予促红细胞生成素治疗还可减轻高糖状态下受损的牙周膜干细胞氧化应激反应^[19]。该研究旨在探讨促红细胞生成素 / 促红细胞生成素受体信号通路对牙周膜干细胞成骨分化的作用机制，为临床治疗提供新思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验。单因素方差分析和 SNK 事后检验，Student's *t* 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 10 月至 2024 年 5 月在山西医科大学第二医院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 前磨牙样本 收集 2022 年 2-10 月在山西医科大学第二医院口腔科就诊且因牙周病需拔除牙齿或进行牙周手术的 25 例患者前磨牙为疾病组，同时取正畸治疗需拔除牙齿的 25 例患者健康前磨牙为健康组。

疾病组纳入标准: ①年龄 20-58 岁；②确诊为牙周炎，探诊深度 ≥ 7 mm，临床附着丧失 ≥ 5 mm，牙龈出血指数 ≥ 2 ；③临床资料完善。

疾病组排除标准: ①心脑血管疾病或肝肾功能障碍；②近 3 个月有牙周治疗史；③近 3 个月使用消炎药、抗生素和免疫抑制剂；④认知障碍或精神异常者。

健康组纳入标准: ①年龄 20-58 岁；②口腔卫生良好，牙石指数 = 0，牙龈无肿胀、出血。

健康组排除标准: ①使用正畸矫正器；②近 3 个月使用消炎药、抗生素和免疫抑制剂；③妊娠和哺乳；④近 2 个月内连续使用含抗菌剂的漱口水；⑤心脑血管疾病或肝肾功能障碍；⑥认知障碍或精神异常者。

受试者均已签署知情同意书，由山西医科大学第二医院医学伦理委员会审查和批准，批准号为 [2021]YX 第 343 号。

1.3.2 主要试剂 促红细胞生成素 (MedChemExpress, 美国); 多能干细胞碱性磷酸酶显色试剂盒、茜素红 S 染色液 (索莱宝, 北京); 成骨诱导分化培养基、成脂诱导分化培养基 (普诺赛, 武汉); Opti-MEM 培养基、MEM 培养基、胎牛血清 (Gibco, 美国); 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (诺维赞, 南京); Trizol、Lipofectamine 3000 试剂盒 (Thermo, 美国); 促红细胞生成素受体小干扰 RNA (small interfering RNA-EPOR, si-EPOR) 及其阴性对照 (si-NC)、si-STAT5 及阴性对照 si-NC (吉玛基因, 上海); 鼠单克隆抗体 β -actin (ab7817)、兔单克隆抗体促红细胞生成素受体 (ab275686)、鼠单克隆抗体基质细胞抗原 1 (ab214086)、兔单克隆抗体 CD146 (ab75769)、兔单克隆抗体 CD45 (ab40763)、兔单克隆抗体磷酸化 STAT5 (p-STAT5, ab32364)、鼠单克隆抗体 STAT5 (ab230670)、鼠单克隆抗体 CD31 (ab9498) (Abcam, 美国)。

1.4 方法

1.4.1 牙周膜干细胞分离与培养 离体牙放入预冷的 MEM 培养基中, 采用含 5% 双抗的 PBS 反复冲洗离体牙, 待清除血块后, 用无菌刀片剥离距牙根 1/3 处的牙周膜组织^[20], PBS 冲洗 3 次后, 将组织置于 3 mg/mL I 型胶原酶中, 37 °C 消化 60 min, 将消化后的组织块重悬于 3 mL MEM 培养液, 于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱培养, 每 3 d 更换 1 次培养液, 7-14 d 可见长梭形样细胞从组织块中爬出, 当细胞融合度约 70% 时, 采用 0.25% 胰酶消化并传代, 培养的第 4 代细胞用于后续实验。

1.4.2 牙周膜干细胞流式鉴定 第 4 代牙周膜干细胞经 0.25% 胰酶消化后, 用预冷 PBS 洗涤 3 次, PBS 重悬细胞, 4 °C 静置 30 min, 分成 5 组, 向各组细胞中分别加入 5 μ L 细胞表面标志物抗体 (STRO-1、CD146、CD45、CD31、空白对照 PBS)^[21], 混匀后 4 °C 避光孵育 1 h; PBS 洗涤 2 次, 离心去上清, 用预冷的 500 μ L PBS 悬浮细胞, 上流式细胞仪检测。

1.4.3 牙周膜干细胞成骨诱导 第 4 代牙周膜干细胞以 1×10^5 L⁻¹ 细胞浓度种于 6 孔板, 每孔 1.5 mL, 培养 48 h 后更换为成骨诱导分化培养基 (包含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青链霉素、1% 谷氨酰胺、0.2% 抗坏血酸、1% β -甘油磷酸钠、0.01% 地塞米松、DMEM 高糖培养基)^[22], 成骨诱导 7 d 进行碱性磷酸酶染色, 成骨诱导 21 d 进行茜素红染色。

1.4.4 牙周膜干细胞成脂诱导 第 4 代牙周膜干细胞以 1×10^5 L⁻¹ 细胞浓度种于 6 孔板, 每孔 1.5 mL, 培养 48 h 后更换为成脂诱导分化培养基 (包含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青链霉素、1 μ mol/L 地塞米松、200 μ mol/L 吡哆美辛、10 μ g/mL 胰岛素、0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、DMEM 高糖培养基)^[23], 成脂诱导 18 d 进行油红 O 染色。

1.4.5 细胞分组与转染 第 4 代对数生长期的牙周膜干细胞以 1×10^5 L⁻¹ 细胞浓度接种于 6 孔板, 每孔 1.5 mL, 待细胞培养至融合度 70%, 未转染细胞采用成骨诱导分化培养基诱导 7 d 或 21 d, 采用成脂诱导分化培养基诱导 18 d 后, 采用 100 ng/mL 促红细胞生成素干预 0, 15, 30, 60, 120 min。需转染细胞采用 Opti-MEM 培养基分别稀释 Lipofectamine 3000 试剂、si-NC/si-EPOR、si-NC/si-STAT5, 将 1 μ g siRNA 与 50 μ L Opti-MEM 培养基混合, 颠倒混匀, 室温放置 5 min, 将 1 μ L Lipofectamine 3000、1 μ L 助转染试剂与 50 μ L Opti-MEM 混合, 混匀后室温放置 5 min。将两种混合物再混合后逐滴加入每孔细胞中, 同时每孔再加 900 μ L Opti-MEM 培养基, 转染 6 h 后, 更换为 1 mL 完全培养基, 继续培养 48 h 后, 进行如下处理: ①转染 si-NC/si-EPOR 后, 采用成骨诱导分化培养基诱导 7 d 或 21 d 进行碱性磷酸酶染色、茜素红染色, 采用成脂诱导分化培养基诱导 18 d 进行油红 O 染色; ②转染 si-NC/si-EPOR 后, 采用 100 ng/mL 促红细胞生成素干预 5 d; ③共转染 si-NC/si-EPOR 或 si-NC/si-STAT5 后, 采用 100 ng/mL 促红细胞生成素干预 5 d。qRT-PCR 检测促红细胞生成素受体、Runt 相关转录因子 2、骨钙素、骨桥素和骨唾液蛋白 mRNA 表达水平; 免疫印迹实验检测促红细胞生成素受体、p-STAT5、STAT5 蛋白表达水平。

1.4.6 数据收集及筛选差异表达基因 从基因表达综合数据库 (gene expression omnibus, GEO) 下载了基因表达数据, 获取和应用方法符合各数据库的指南和政策。数据集 GSE16134 和 GSE10334 基于 GPL570 平台, 由 Affymetrix Human Gene 2.0 ST Array 处理, GSE16134 包含 241 例牙周患者和 69 名健康人群, 数据集 GSE10334 包含 183 例牙周患者和 64 名健康人群。利用 R studio 软件 (版本 4.2.3) limma 软件包分析差异表达基因, 以 $P < 0.05$ 和 logFC 绝对值 > 1.5 进行筛选。

1.5 主要观察指标

1.5.1 免疫印迹实验检测蛋白表达水平 经转染 siRNA 或采用促红细胞生成素处理的细胞, 弃去培养基, PBS 洗 2 遍, 每孔加入 100 μ L 细胞裂解液刮下细胞, 移入新的 1.5 mL EP 管中, 冰上裂解 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清与 6 x loading buffer 涡旋混匀, 98 °C 15 min 使蛋白变性, 经 10% SDS-PAGE 胶分离蛋白后, 湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜, 转膜条件为 300 mA, 2 h, 用含 5% BSA 的 TBST 封闭液室温孵育 1 h, 加入一抗 (促红细胞生成素受体, 1 : 1 000; p-STAT5, 1 : 1 000; STAT5, 1 : 1 000), 4 °C 孵育过夜, 次日加入二抗 (1 : 5 000 稀释), 室温孵育 2 h, 采用 ECL 发光液发光, 用 Image J 软件分析条带灰度值, 以 β -actin 为内参, 计算目的基因灰度值 / β -actin 灰度值, 比值代表蛋白相对表达量。

1.5.2 碱性磷酸酶染色检测细胞成骨分化能力 采用多能干细胞碱性磷酸酶显色试剂盒，牙周膜干细胞经 40 g/L 多聚甲醛室温固定 30 min，PBS 冲洗 3 次后，加入显色缓冲液避光孵育 30 min，用蒸馏水洗涤 3 次后，显微镜下观察拍照。用 Image J 软件统计胞浆内出现蓝色沉淀的阳性细胞个数，计算阳性率。

1.5.3 茜素红染色检测细胞成骨分化能力 牙周膜干细胞去除培养液，加入 40 g/L 多聚甲醛室温固定 30 min，PBS 冲洗 3 次后，加入 2% 茜素红 S 染色液室温孵育 10 min，显微镜下观察拍照，然后每孔加入 10% 氯化十六烷基吡啶溶解后，酶标仪检测 562 nm 波长处吸光度值，每个样本设置 3 个复孔，计算平均值。

1.5.4 油红 O 染色检测细胞成脂分化能力 牙周膜干细胞去除培养液，加入 40 g/L 多聚甲醛室温孵育 30 min，PBS 冲洗 3 次后，采用 60% 异丙醇溶液平衡 2 次，每次 5 min，配置 0.3% 油红 O 染色液并过滤，37 °C 避光染色 60 min，用 60% 异丙醇溶液分化以停止染色，纯水洗净多余染料，显微镜下观察拍照，用 Image J 软件分析统计阳性染色面积。

1.5.5 qRT-PCR 检测基因表达水平 采用 1 mL Trizol 裂解细胞，然后加入 200 μ L 氯仿，剧烈振荡 10 s，4 °C、12 000 r/min 离心 10 min，吸出上层水相 400 μ L 移入新的无酶 EP 管中，加 400 μ L 异丙醇，4 °C、12 000 r/min 离心 10 min，弃上清，加入 1 mL 体积分数 75% 乙醇，4 °C、7 500 r/min 离心 5 min，弃上清，空气中晾干至沉淀块由白色转为半透明时加入无 RNA 酶水 50 μ L 溶解 RNA。将 RNA 反转录合成 cDNA，以此为模板，采用 qRT-PCR 检测促红细胞生成素受体及成骨标志基因 Runt 相关转录因子 2、骨钙素、骨桥素、骨唾液蛋白的表达水平。以 β -actin 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 | 引物序列

Table 1 | Primer sequences

基因	引物序列	片段长度 (bp)
促红细胞生成素受体	F: 5'- TTC TGT GCT TCA CCG AGC GGT T -3' R: 5'- CGA CAC AGC TTC CAT GGC TCA T -3'	98
Runt 相关转录因子 2	F: 5'- CCC AGT ATG AGA GTA GGT GTC C -3' R: 5'- GGG TAA GAC TGG TCA TAG GAC C -3'	103
骨钙素	F: 5'- CGC TAC CTG TAT CAA TGG CTG G -3' R: 5'- CTC CTG AAA GCC GAT GTG GTC A -3'	91
骨桥素	F: 5'- CGA GGT GAT AGT GTG GTT TAT GG -3' R: 5'- GCA CCA TTC AAC TCC TCG CTT TC -3'	84
骨唾液蛋白	F: 5'- GGC AGT AGT GAC TCA TCC GAA G -3' R: 5'- GAA AGT GTG GTA TTC TCA GCC TC -3'	86
β -actin	F: 5'- AGA GCC TCG CCT TTG CCG ATC C -3' R: 5'- CTG GGC CTC GTC GCC CAC ATA -3'	106

1.6 统计学分析 利用 GraphPad Prism 8.0 进行数据分析及作图，符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示，多组间数据比较采用单因素方差分析 (ANOVA)，两组间

比较采用 Student's *t* 检验。图像资料用 Image J(NIH) 软件分析。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。该研究统计学方法已经通过山西医科大学第二医院生物统计学专家审核。

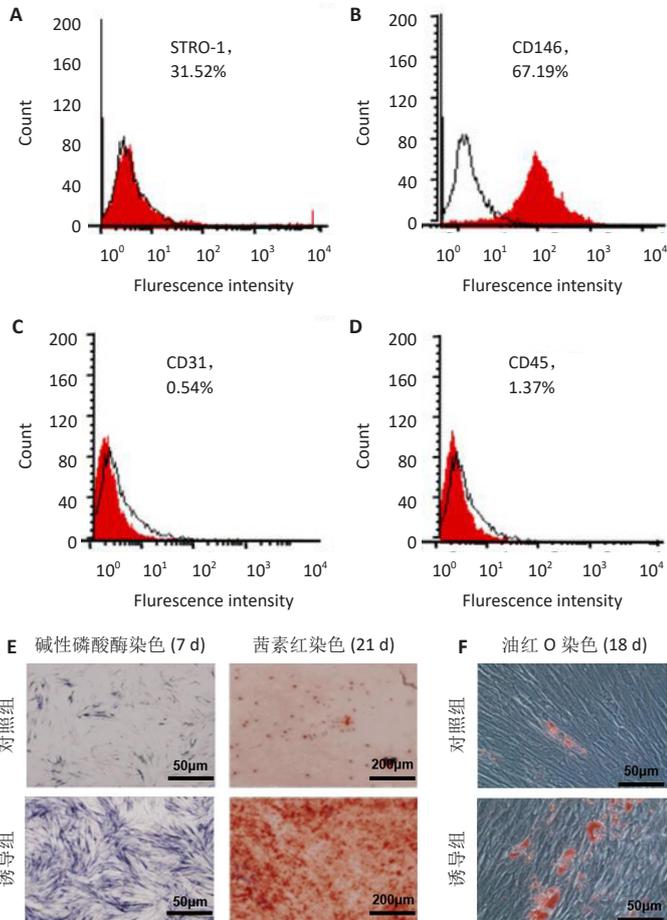
2 结果 Results

2.1 牙周膜干细胞鉴定结果 流式细胞仪检测结果显示，健康组牙周膜干细胞阳性表达间充质干细胞表面标记物 STRO-1(31.52%)、CD146(67.19%)；阴性表达血小板内皮细胞标记物 CD31(0.54%) 及白细胞共同抗原 CD45(1.37%)，见图 1A-D。细胞经成骨诱导 7，21 d 后，碱性磷酸酶染色和茜素红染色结果显示，与对照组相比，诱导后牙周膜干细胞成骨分化能力增强 (图 1E)；细胞经成脂诱导 18 d 后，油红 O 染色结果显示，与对照组相比，诱导后牙周膜干细胞脂滴增多 (图 1F)，表明牙周膜干细胞具备多向分化潜能，显示出良好的干细胞特性。

2.2 促红细胞生成素受体在疾病组及对照组牙周膜干细胞中的表达 通过对 GEO 数据库 GSE16134 和 GSE10334 数据集的分析发现，牙周手术患者感染组织中促红细胞生成素受体的表达低于未感染组织，牙周炎牙龈组织中促红细胞生成素受体的表达低于健康人群 (图 2A, B, $P < 0.01$)。采用 qRT-PCR 和免疫印迹法检测分离培养的健康组及疾病组牙周膜干细胞中促红细胞生成素受体的 mRNA 和蛋白水平，结果显示，疾病组牙周膜干细胞中促红细胞生成素受体的 mRNA 和蛋白水平显著低于健康组牙周膜干细胞 (图 2C, D, $P < 0.01$)。

2.3 敲低促红细胞生成素受体抑制牙周膜干细胞成骨分化 在健康组牙周膜干细胞中分别转染 si-NC 或 si-EPOR，经免疫印迹法和 qRT-PCR 检测验证促红细胞生成素受体敲低成功 (图 3A, B, $P < 0.05$)。成骨诱导培养 7 d 后碱性磷酸酶染色以及成骨诱导 21 d 后茜素红染色结果显示，敲低促红细胞生成素受体抑制牙周膜干细胞的成骨分化能力 (图 3C, $P < 0.05$)。qRT-PCR 结果显示，与 si-NC 组相比，si-EPOR 组 Runt 相关转录因子 2、骨钙素、骨桥素和骨唾液蛋白的表达水平显著降低 (图 3D, $P < 0.05$)。

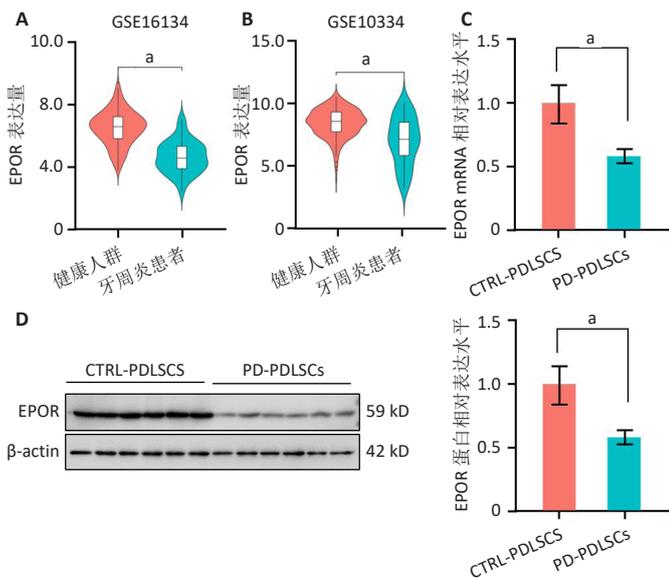
2.4 促红细胞生成素对牙周膜干细胞成骨分化的影响 qRT-PCR 结果表明，促红细胞生成素处理后，疾病组牙周膜干细胞中促红细胞生成素受体表达恢复 (图 4A, $P < 0.05$)，使用 si-EPOR 敲低促红细胞生成素受体后再给予促红细胞生成素处理，同样逆转了促红细胞生成素受体的表达水平 (图 4B, $P < 0.01$)。茜素红染色结果显示，促红细胞生成素处理后，提升了疾病组牙周膜干细胞成骨分化能力，以及成骨标志基因 Runt 相关转录因子 2 的表达水平 (图 4C-E, $P < 0.05$)，提示促红细胞生成素通过诱导促红细胞生成素受体表达增加，促进牙周膜干细胞成骨分化。



图注：图 A-D 为流式细胞仪检测细胞表面标志物 STRO-1、CD146、CD31、CD45；E 为牙周膜干细胞经成骨诱导后碱性磷酸酶染色及茜素红染色；F 为牙周膜干细胞经成脂诱导后油红 O 染色。

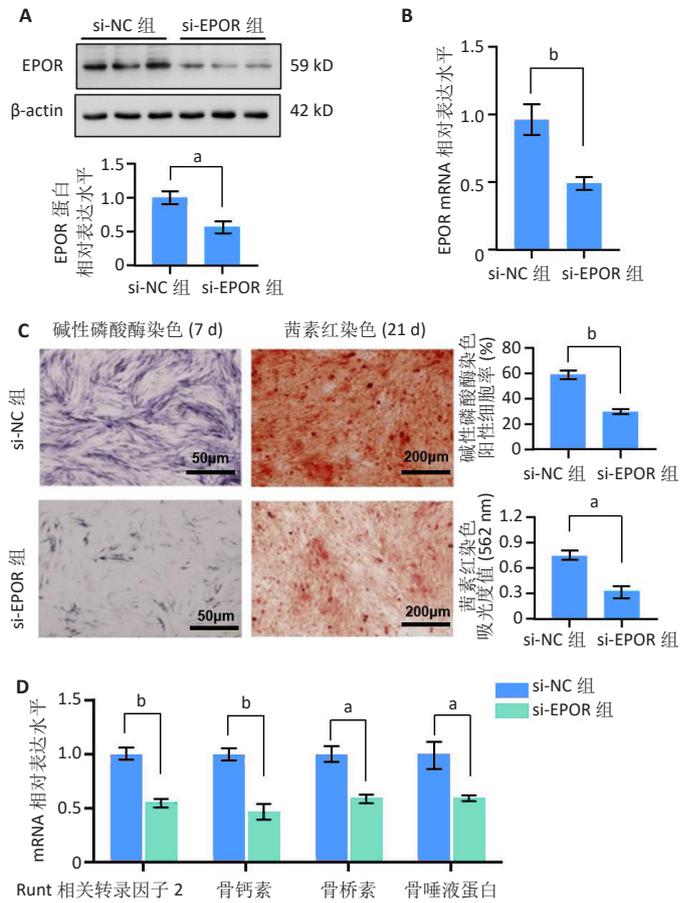
图 1 | 人牙周膜干细胞鉴定

Figure 1 | Identification of human periodontal ligament stem cells



图注：图 A, B 为 GSE16134 和 GSE10334 数据集中 EPOR 的表达量；C 为 qRT-PCR 检测牙周膜干细胞中 EPOR mRNA 水平；D 为免疫印迹法检测牙周膜干细胞中 EPOR 蛋白水平。^a $P < 0.01$ 。CTRL-PDLSCs: 健康牙周膜干细胞；PD-PDLSCs: 疾病组牙周膜干细胞。

图 2 | 牙周炎组织及牙周膜干细胞中促红细胞生成素受体 (EPOR) 的表达
Figure 2 | Expression of erythropoietin receptor (EPOR) in periodontitis tissues and periodontal ligament stem cells



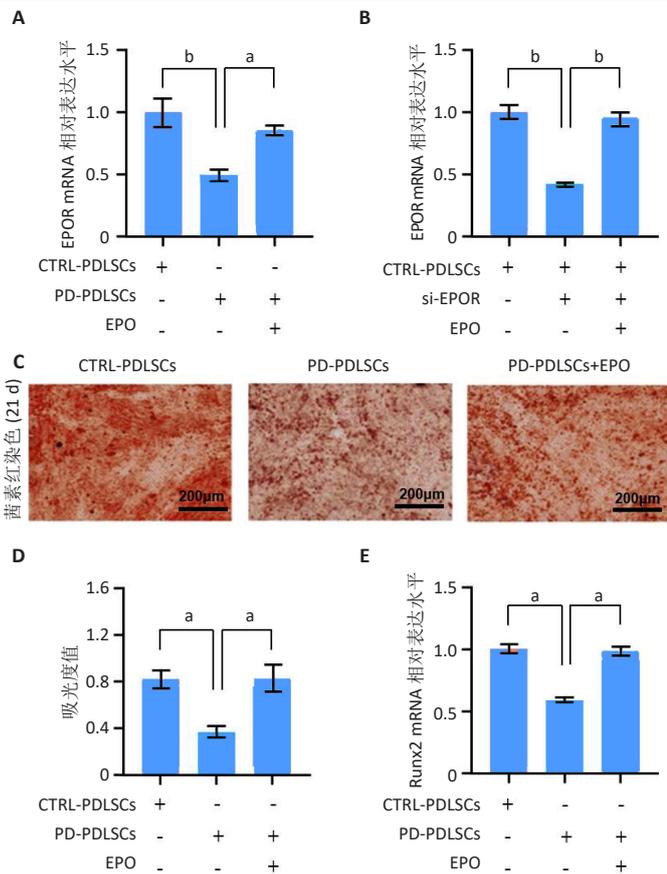
图注：图 A 为免疫印迹法检测牙周膜干细胞中 EPOR 蛋白表达水平；B 为 qRT-PCR 检测牙周膜干细胞中 EPOR mRNA 表达水平；C 为碱性磷酸酶染色及茜素红染色检测细胞成骨分化能力；D 为 qRT-PCR 检测 Runx2 相关转录因子 2、骨钙素、骨桥素、骨唾液蛋白的表达水平。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

图 3 | 敲低促红细胞生成素受体 (EPOR) 抑制牙周膜干细胞成骨分化
Figure 3 | Knockdown of erythropoietin receptor (EPOR) inhibits osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells

2.5 促红细胞生成素诱导牙周膜干细胞中 STAT5 的磷酸化，促进成骨分化 蛋白质免疫印迹实验结果显示，随着促红细胞生成素处理时间的延长，疾病组牙周膜干细胞中 STAT5 磷酸化水平增加 (图 5A, $P < 0.01$)。qRT-PCR 结果显示，使用 si-STAT5 沉默 STAT5 表达后，抑制了促红细胞生成素诱导的 Runx2 相关转录因子 2 和骨钙素表达水平的增多 (图 5B, C, $P < 0.05$)，提示促红细胞生成素通过诱导 STAT5 的磷酸化，恢复病理性牙周膜干细胞的成骨分化能力。

3 讨论 Discussion

牙周膜干细胞具有自我更新和多向分化潜能，可分化为成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞，是再生医学中各类型组织修复的重要细胞来源^[24-26]。在实验过程中，从健康人群和牙周炎患者前磨牙分离培养的牙周膜干细胞具有成骨及成脂分化潜能。近年来研究发现，牙周膜干细胞促进了牙周附着组织的再生、修复，在牙周骨缺损修复及牙周样组织形成中发挥重要作用，牙周膜祖细胞和

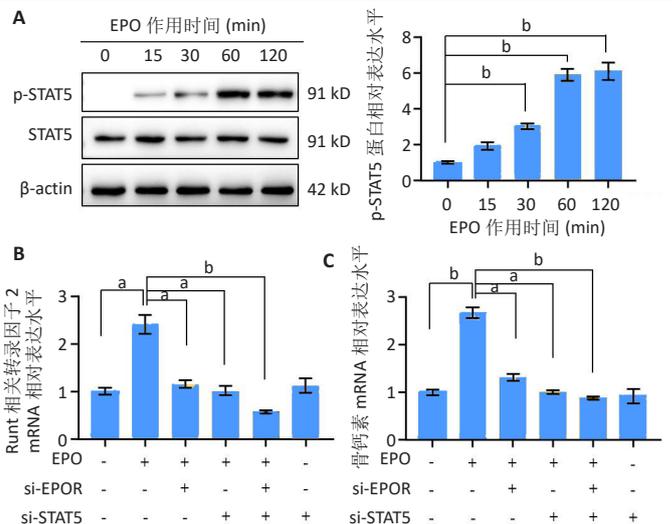


图注: 图 A, B 为 qRT-PCR 检测细胞 EPOR mRNA 表达水平; C, D 为茜素红染色检测细胞成骨分化能力; E 为 qRT-PCR 检测 Runx2 mRNA 表达水平。^aP < 0.05, ^bP < 0.01。CTRL-PDLSCs: 健康组牙周膜干细胞; PD-PDLSCs: 疾病组牙周膜干细胞; Runx2: Runt 相关转录因子 2。

图 4 | 促红细胞生成素 (EPO) 诱导促红细胞生成素受体 (EPOR) 表达增加, 促进牙周膜干细胞成骨分化
Figure 4 | Erythropoietin (EPO) induction of erythropoietin receptor (EPOR) expresses and promotes periodontal ligament stem cell differentiation

牙周膜干细胞自体移植是牙周炎患者牙槽骨修复的一种治疗途径^[27]。但由于牙周炎患者健康的牙周膜干细胞有限, 病理性牙周膜干细胞成为自体牙周细胞治疗的候选细胞^[28]。同时, SONODA 等^[29]研究表明可通过药理学方法恢复病理性组织干细胞的受损功能。

重组促红细胞生成素多用于治疗慢性肾脏病和癌症患者的继发性贫血, 而促红细胞生成素 / 促红细胞生成素受体信号通路在调节神经祖细胞存活、增殖和分化过程中发挥重要作用^[30-32]。研究发现, 外源性促红细胞生成素恢复了病理性牙周膜干细胞的促红细胞生成素受体表达, 并逆转了牙周炎患者牙周膜干细胞成骨分化能力的降低, 增强了疾病特异性组织干细胞的功能, 这在骨髓间充质干细胞中也有所体现。YAMAHA 等^[33]研究发现, 在骨髓间充质干细胞中激活促红细胞生成素 / 促红细胞生成素受体 / STAT5 信号通路, 恢复了皮下异位移植间充质干细胞后的造血功能。此外, 促红细胞生成素受体信号通路作为一种微环境调节剂, 对牙周膜干细胞的旁分泌有重要的调节作用^[34-36]。



图注: 图 A 为蛋白质免疫印迹法检测细胞促红细胞生成素受体 (EPOR) 表达水平; B, C 为 qRT-PCR 检测 Runt 相关转录因子 2 及骨钙素的表达水平。^aP < 0.05, ^bP < 0.01。

图 5 | 促红细胞生成素 (EPO) 诱导牙周膜干细胞中信号转导及转录激活因子 5 (STAT5) 的磷酸化, 促进成骨分化
Figure 5 | Erythropoietin (EPO) induces phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in periodontal ligament stem cells and promotes osteogenic differentiation

促红细胞生成素受体 / STAT5 信号通路在体内造血干细胞和红系祖细胞的微环境调节中具有重要意义^[37-39]。STAT5 作为各种细胞因子、激素和生长因子激活的转录因子, 其活化后转位到细胞核中, 调节靶基因的转录, 影响多个生物学过程^[40]。然而, 促红细胞生成素 / 促红细胞生成素受体 / STAT5 信号通路在非造血干细胞 (如间充质干细胞) 中的作用尚不清楚。此研究在牙周膜干细胞中沉默促红细胞生成素受体的表达, 抑制了牙周膜干细胞的成骨分化能力。BULUT 等^[41]研究发现, 促红细胞生成素通过诱导 STAT5 磷酸化, 负反馈调节泛素化介导的内吞作用, 进而抑制红细胞表面促红细胞生成素受体的表达, 提出促红细胞生成素受体下调作为一种防御机制, 以对抗受体信号传导引起的细胞过度增殖。此研究提出了促红细胞生成素受体的另一种正反馈调节机制, 在病理环境中恢复组织干细胞的功能, 即促红细胞生成素刺激诱导了病理性牙周膜干细胞中促红细胞生成素受体 mRNA 和蛋白水平升高, 增加 STAT5 磷酸化, 上调成骨标志基因 Runt 相关转录因子 2 的表达水平, 从而促进病理性牙周膜干细胞成骨分化能力的恢复。

但由于研究局限于细胞水平, 促红细胞生成素 / 促红细胞生成素受体 / STAT5 信号通路在牙周疾病中的具体作用还需进一步在动物水平加以验证。

综上所述, 通过基因沉默和配体诱导激活调控促红细胞生成素受体, 证明了促红细胞生成素 / 促红细胞生成素受体对牙周膜干细胞成骨分化的重要作用, 发现促红

细胞生成素通过诱导 STAT5 的磷酸化, 恢复病理性牙周膜干细胞的成骨分化能力, 为牙周病的临床治疗提供了一种新思路。

作者贡献: 孙峥、赵华负责实验设计、实验实施、论文撰写, 孙峥负责细胞培养、指标检测、实验数据分析处理, 赵华负责数据和文章的校对。

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。

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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写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》; 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为文章符合期刊投稿宗旨。

4 参考文献 References

- JIN S, JIANG H, SUN Y, et al. Osteogenic differentiation of periodontal membrane stem cells in inflammatory environments. *Open Life Sci.* 2022; 17(1):1240-1248.
- EASTER QT, FERNANDES MATUCK B, BELDORATI STARK G, et al. Single-cell and spatially resolved interactomics of tooth-associated keratinocytes in periodontitis. *Nat Commun.* 2024;15(1):5016.
- LIU A, HAYASHI M, OHSUGI Y, et al. The IL-33/ST2 axis is protective against acute inflammation during the course of periodontitis. *Nat Commun.* 2024; 15(1):2707.
- KENDLBACHER FL, BLOCH S, HAGER-MAIR FF, et al. Red-complex bacteria exhibit distinctly different interactions with human periodontal ligament stromal cells compared to *Fusobacterium nucleatum*. *Arch Oral Biol.* 2024; 164:106004.
- KULTHANAAMONDHITA P, KORNSUTHISOPON C, CHANSAENROJ A, et al. MicroRNA expression in JAG1/Notch-activated periodontal ligament stem cells. *BDJ Open.* 2024;10(1):45.
- LUO S, LI Z, LIU L, et al. Static magnetic field-induced IL-6 secretion in periodontal ligament stem cells accelerates orthodontic tooth movement. *Sci Rep.* 2024;14(1):9851.
- ZHANG Y, CHEN Y, DING T, et al. Janus porous polylactic acid membranes with versatile metal-phenolic interface for biomimetic periodontal bone regeneration. *NPJ Regen Med.* 2023;8(1):28.
- CHEN H, ZHANG L, DU S, et al. Triptolide mitigates the inhibition of osteogenesis induced by TNF- α in human periodontal ligament stem cells via the p-I κ B α /NF- κ B signaling pathway: an in-vitro study. *BMC Complement Med Ther.* 2024;24(1):113.
- PENG B, KONG G, YANG C, et al. Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immune regulation. *Cell Death Dis.* 2020;11(2):79.
- CURTO Y, CARCELLER H, KLIMCZAK P, et al. Erythropoietin restrains the inhibitory potential of interneurons in the mouse hippocampus. *Mol Psychiatry.* 2024;29(10):2979-2996.
- LUNA SE, CAMARENA J, HAMPTON JP, et al. Enhancement of erythropoietin output by Cas9-mediated insertion of a natural variant in haematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Biomed Eng.* 2024. doi: 10.1038/s41551-024-01222-6.
- TÓTHOVÁ Z, TOMC J, DEBELIAK N, et al. STAT5 as a Key Protein of Erythropoietin Signaling. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):7109.
- HIDALGO D, BEJDER J, POP R, et al. EpoR stimulates rapid cycling and larger red cells during mouse and human erythropoiesis. *Nat Commun.* 2021; 12(1):7334.
- DEY S, LEE J, NOGUCHI CT. Erythropoietin Non-hematopoietic Tissue Response and Regulation of Metabolism During Diet Induced Obesity. *Front Pharmacol.* 2021;12:725734.
- SURESH S, RAJVANSHI PK, NOGUCHI CT. The Many Facets of Erythropoietin Physiologic and Metabolic Response. *Front Physiol.* 2020;10:1534.
- QIAN L, ZHU Y, DENG C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) family in physiological and pathophysiological process and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):50.
- ZHENG DH, WANG XX, MA D, et al. Erythropoietin enhances osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Drug Des Devel Ther.* 2019;13:2543-2552.
- WANG L, WU F, SONG Y, et al. Erythropoietin induces the osteogenesis of periodontal mesenchymal stem cells from healthy and periodontitis sources via activation of the p38 MAPK pathway. *Int J Mol Med.* 2018;41(2):829-835.
- ZHENG DH, HAN ZQ, WANG XX, et al. Erythropoietin attenuates high glucose-induced oxidative stress and inhibition of osteogenic differentiation in periodontal ligament stem cell (PDLSCs). *Chem Biol Interact.* 2019;305: 40-47.
- ZHAO Z, SUN Y, QIAO Q, et al. Human Periodontal Ligament Stem Cell and Umbilical Vein Endothelial Cell Co-Culture to Prevascularize Scaffolds for Angiogenic and Osteogenic Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):12363.
- 何琴, 卜艳, 林光磊, 等. RNA 结合蛋白 Lin28A 差异表达可调控牙周膜干细胞的成骨分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(33):5283-5291.
- 王成龙, 杨志烈, 常君丽, 等. 补骨脂素对环磷酰胺抑制小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的恢复作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2025, 29(1):16-23.
- 刘彧冰, 蓝春花, 卢娜, 等. 成脂诱导剂通过 PP2Ac 调控人肝星状细胞活化的体外研究 [J]. *广西医科大学学报*, 2023, 40(9):1433-1439.
- SUN H, FENG Y, TU S, et al. Dopamine promotes osteogenic differentiation of PDLSCs by activating DRD1 and DRD2 during orthodontic tooth movement via ERK1/2 signaling pathway. *Regen Ther.* 2024;27:268-278.
- ZHAO Z, LIU J, WEIR MD, et al. Periodontal ligament stem cell-based bioactive constructs for bone tissue engineering. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:1071472.
- QUEIROZ A, ALBUQUERQUE-SOUZA E, GASPARONI LM, et al. Therapeutic potential of periodontal ligament stem cells. *World J Stem Cells.* 2021;13(6): 605-618.
- YANG S, YIN Y, SUN Y, et al. AZGP1 Aggravates Macrophage M1 Polarization and Pyroptosis in Periodontitis. *J Dent Res.* 2024;103(6):631-641.
- LYU J, SHEN S, HAO Y, et al. The impact of Thiopeptide antibiotics on inflammatory responses in periodontal tissues through the regulation of the MAPK pathway. *Int Immunopharmacol.* 2024;133:112094.
- SONODA S, MEI YF, ATSUTA I, et al. Exogenous nitric oxide stimulates the odontogenic differentiation of rat dental pulp stem cells. *Sci Rep.* 2018; 8(1):3419.
- SCHMID H, SCHIFFL H. Erythropoiesis stimulating agents and anaemia of end-stage renal disease. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2010; 8(3):164-172.
- SUSANTAD T, FUANGTHONG M, THARAKARAMAN K, et al. Modified recombinant human erythropoietin with potentially reduced immunogenicity. *Sci Rep.* 2021;11(1):1491.
- WU HHL, CHINNADURAI R. Erythropoietin-Stimulating Agent Hyporesponsiveness in Patients Living with Chronic Kidney Disease. *Kidney Dis (Basel).* 2022;8(2):103-114.
- YAMAZA T, MIURA Y, AKIYAMA K, et al. Mesenchymal stem cell-mediated ectopic hematopoiesis alleviates aging-related phenotype in immunocompromised mice. *Blood.* 2009;113(11):2595-2604.
- ZAKARIA MF, SONODA S, KATO H, et al. Erythropoietin receptor signal is crucial for periodontal ligament stem cell-based tissue reconstruction in periodontal disease. *Sci Rep.* 2024;14(1):6719.
- ZHAO Y, ZHAO K, FANG J, et al. Hemoglobin level and erythropoietin response in hemodialysis patients: what can we pay attention to? *Ren Fail.* 2024;46(1):2353338.
- WU Y, CHEN W, ZHANG Y, et al. Potent Therapy and Transcriptional Profile of Combined Erythropoietin-Derived Peptide Cyclic Helix B Surface Peptide and Caspase-3 siRNA against Kidney Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2020;375(1):92-103.
- ZHAO X, GAN L, HOU FF, et al. The influencing factors of the erythropoietin resistance index and its association with all-cause mortality in maintenance hemodialysis patients. *Ren Fail.* 2024;46(1):2290922.
- NINGNING Y, YING X, XIANG L, et al. Danggui-Shaoyao San alleviates cognitive impairment via enhancing HIF-1 α /EPO axis in vascular dementia rats. *J Ethnopharmacol.* 2024;331:118306.
- SUN N, WANG Z, JIANG H, et al. Angelica sinensis polysaccharides promote extramedullary stress erythropoiesis via ameliorating splenic glycolysis and EPO/STAT5 signaling-regulated macrophages. *J Mol Histol.* 2024;55(5): 661-673.
- SEONG S, KIM JH, KIM K, et al. Alternative regulatory mechanism for the maintenance of bone homeostasis via STAT5-mediated regulation of the differentiation of BMSCs into adipocytes. *Exp Mol Med.* 2021;53(5): 848-863.
- BULUT GB, SULAHIAN R, MA Y, et al. Ubiquitination regulates the internalization, endolysosomal sorting, and signaling of the erythropoietin receptor. *J Biol Chem.* 2011;286(8):6449-6457.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZLJ)

促红细胞生成素及受体信号通路调控牙周膜干细胞成骨分化的机制

文章特色分析

一、文章重要性

本文聚焦于牙周炎治疗这一临床难题。牙周炎会导致牙槽骨破坏和牙齿脱落，传统治疗方法效果有限。文章指出，利用牙周膜干细胞进行组织再生是当前的重要研究方向。然而，牙周炎患者的牙周膜干细胞其成骨分化能力受损，限制了其治疗效果。

因此，本研究的重要性在于：

- 直击临床痛点：研究旨在探索恢复病理性牙周膜干细胞功能的机制，为解决牙周炎骨缺损修复的瓶颈问题提供了潜在的细胞层面的解决方案。
- 开拓治疗新靶点：研究将原本主要用于造血系统调节的促红细胞生成素/促红细胞生成素受体信号通路引入牙周组织再生领域，为开发新的药物靶点或治疗策略奠定了理论基础。

二、文章创新性特色

本文的创新性主要体现在以下三个层面：

1. 研究视角的创新：首次系统地揭示了促红细胞生成素/促红细胞生成素受体信号通路在人牙周膜干细胞成骨分化中的关键作用。此前该通路的研究多集中于造血系统或神经等领域，本研究将其功能拓展至口腔组织工程与再生医学领域，视角新颖。
2. 研究模型的深度：研究并未停留在简单的现象观察，而是通过严谨的实验设计深入探讨了其作用机制。

• 通过对比健康组与疾病组牙周膜干细胞，首先证实了促红细胞生成素受体表达水平的下调与牙周炎的病理状态相关。

• 利用基因沉默（siRNA）和配体激活（促红细胞生成素处理）两种方法，正反验证了该通路对成骨分化的调控作用。

• 最终将作用机制锁定在 STAT5 转录因子的磷酸化这一关键下游事件上，构建了“促红细胞生成素→促红细胞生成素受体→STAT5 磷酸化→成骨分化”的信号通路模型。

3. 机制发现的创新：文章提出了一种正反馈调节机制。即促红细胞生成素不仅能激活下游信号，还能反过来上调病理性牙周膜干细胞中促红细胞生成素受体的表达，从而“修复”受损的信号通路，恢复细胞的成骨功能。这一发现为理解药物如何“逆转”病理状态下细胞功能受损提供了新见解。

三、对学科的启示

本研究的结果对口腔再生医学、组织工程乃至干细胞生物学领域具有重要的启示意义：

1. 为“老药新用”提供理论依据：促红细胞生成素是一种已广泛应用于临床的成熟药物。本研究提示，它可能被重新定位用于辅助牙周炎的治疗，例如在牙周手术局部应用以促进骨组织再生，这具有巨大的临床转化潜力。
2. 深化对病理性干细胞功能修复的认识：研究表明，通过药理学手段（如促红细胞生成素）靶向特定的信号通路，可以有效恢复病理性组织干细胞的功能。这一理念可推广至其他疾病相关的干细胞研究，为治疗各种退行性疾病和组织损伤提供了新的思路。
3. 推动精准化牙周治疗策略的发展：研究揭示了 STAT5 是促红细胞生成素发挥作用的关键节点。未来或可基于此开发更精准的疗法，如设计特异性激活 STAT5 的小分子药物，避免促红细胞生成素可能带来的全身性副作用，实现更安全、高效的靶向治疗。

总结而言，该文章的重要性在于其针对牙周炎骨再生这一临床难题，创新性地发现并验证了促红细胞生成素/促红细胞生成素受体/STAT5 信号通路在调控牙周膜干细胞成骨分化中的核心作用，不仅为牙周治疗提供了新的潜在靶点，也为利用已有药物修复病理状态下干细胞功能这一策略提供了重要的理论支持和实验证据，对推动组织工程和再生医学的发展具有积极的启示作用。