

网络出版时间: 2019-3-26 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190322.1759.013.html>

ephrinB2 基因转染脱落乳牙来源的牙髓干细胞 提高其成骨/成牙本质分化的研究

胡晓燕¹, 朱绍跃^{2*}, 徐建光¹, 李午丽¹, 张菁¹

摘要 目的 观察促红细胞生成素肝细胞激酶受体 B4/促红细胞生成素肝细胞激酶受体配体 B2 (EphB4/ephrinB2) 信号通路在调控过表达 ephrinB2 的脱落乳牙来源牙髓干细胞 (SHEDs) 成骨/成牙本质分化中的作用。方法 从滞留乳牙中分离出 SHEDs, 用 hEfnB2-GFP-Bsd 载体和空载体 (GFP-Bsd) 转染后进行成骨/成牙本质分化诱导。用反转录聚合酶链反应 (RT-PCR)、碱性磷酸酶实验 (ALP) 实验、茜素红 S 染色实验来检测 EfnB2-SHEDs 组、空载体对照组 (Vector-SHEDs) 的成骨分化效果, 并用 Western blot、免疫沉淀和免疫共沉淀试验来检测 ephrinB2 和 EphB4 磷酸化蛋白表达水平。结果 ALP 实验和茜素红 S 染色实验证实: EfnB2-SHEDs 组比 Vector-SHEDs 组表现出更高的 ALP 活性和矿化能力。RT-PCR 显示: EfnB2-SHEDs 组成牙本质/成骨标志物的表达明显高于 Vector-SHEDs 组, 在成骨分化中, EphB4 受体通过磷酸化被活化。结论 基因转染 ephrinB2 能够通过刺激 ephrinB2 和 EphB4 的磷酸化来提高 SHEDs 的成骨/成牙本质分化。

关键词 乳牙牙髓干细胞; ephrinB2; 基因转染; 成骨分化

中图分类号 R 781.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)04-0564-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.013

牙齿相关疾病所造成的牙槽骨、牙骨质和牙周膜的破坏是导致成人牙齿丧失的主要原因。从人类乳牙的牙髓组织中分离鉴定出的牙髓干细胞 (stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHEDs) 具有成骨、成牙本质等多向分化潜能, 与其它干细胞相比, 乳牙来源的 SHEDs 是更易于获得的干细胞来

源^[1]; 研究^[2]表明, 基因转染促红细胞生成素肝细胞激酶受体配体 B2 (erythropoietin-producing hepatocellular receptor interacting protein-B2, ephrinB2) 能够诱导间充质干细胞的成骨分化。该研究旨在明确 ephrinB2 在调控 SHEDs 成骨分化中的作用, 通过使 SHEDs 过表达 ephrinB2 来观察 SHEDs 中 ephrinB2 和促红细胞生成素肝细胞激酶受体 B4 (erythropoietin-producing hepatocyte B4, EphB4) 之间如何通过信号串扰来增加细胞的成骨能力; ephrinB2 和 EphB4 信号通路如何在 SHEDs 和前成骨细胞的共培养中发挥相互作用以提高成骨活性。

1 材料与方法

1.1 细胞分离与鉴定 实验涉及的所有试剂、细胞及乳牙获得了安徽医科大学伦理委员会的同意。将拔除的滞留乳牙在无菌环境下进行牙髓提取, I 型胶原蛋白酶和中性蛋白酶消化获得细胞混悬液。在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 将获得的细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基中培养至第 3 代, 流式细胞仪检测其干细胞特性, 检测 STRO-1、CD45、CD73、CD90 和 CD105 表面标志物的表达。然后再分别用各自的诱导培养基做成骨/成牙本质、成脂、成神经分化试验。分别用 2% 茜素红 S 染色实验、0.21% 油红 O 染色实验以及荧光免疫检测多向分化能力。

1.2 慢病毒载体转染细胞 转染病毒购自美国 GenTarget 公司, 将 EfnB2-绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)-Bsd (实验组) 或空载体 GFP-Bsd (对照组) 转染入 SHEDs, 具体如下: 当细胞增殖达到 50% 融合时, 将 EfnB2-GFP-Bsd 和 GFP-Bsd 分别加入培养基中, 慢病毒的转染需要在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中维持 24 h。筛选稳定的转染细胞后, 将 1 × 10⁵ 的 SHEDs、空载体 SHEDs (Vector-SHEDs)、EfnB2-SHEDs 种入 6 孔板中, 37 °C 孵育 24 h, 荧光倒置显微镜下观察转染效果。ephrinB2 的 mRNA 和蛋白表达水平用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测。

2018-11-05 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目 (编号: KJ2016A324、KJ2018A0199); 安徽省自然科学基金 (编号: 1508085SQH222)

作者单位: ¹ 安徽医科大学口腔医学院、安徽医科大学附属口腔医院、安徽省口腔疾病研究重点实验室, 合肥 230032

² 徐州医科大学附属徐州口腔医院, 徐州 221002

作者简介: 胡晓燕, 女, 副主任医师, 讲师, 责任作者, E-mail: 273640765@qq.com

* 对本文具有同等贡献

1.3 细胞增殖实验 用 CCK-8 试剂盒进行细胞增殖实验,具体如下:将每孔细胞密度为 1×10^4 的 EfnB2-SHEDs 和 Vector-SHEDs 悬液种在 96 孔板中过夜(37 °C、5% CO₂)。分别在第 0、2、4、6、8 天加入 CCK-8 溶液,37 °C、5% CO₂ 孵育 4 h,随后在酶标仪上检测,检测吸收波长为 450 nm。根据所测得吸光度(optical density, OD) 值计算每组细胞增殖活力。

1.4 细胞迁移实验 分别将每孔细胞密度为 1×10^5 的 EfnB2-SHEDs 和 Vector-SHEDs 放入 24 孔板上室培养,分别在第 6、8、10、12 小时计数迁移到下室的细胞数。

1.5 成骨诱导 将 1×10^4 Vector-SHEDs 和 EfnB2-SHEDs 种入 24 孔板,培养至 70% 融合时加入成骨诱导培养基培养。12 d 后行碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP) 实验,染色细胞在倒置相差显微镜下观察并拍照。21 d 后,细胞用 4% 的多聚甲醛固定,2% 茜素红染色以检测矿化结节,显微镜下观察拍照。用 Quantity One 1-D 分析软件分析 ALP 和茜素红染色的强度。

1.6 RT-PCR 用 RNeasy Mini kit 试剂盒提取单独培养的 Vector-SHEDs 和 EfnB2-SHEDs 的总 RNA,并用 RNase-Free DNase kit 试剂盒纯化;随后,用 SuperScript III 反转录酶将 1.0 μg 的总 RNA 合成 cDNA,并用 Nanodrop2000 分光光度计来进行定量。用 ABI Prism 7000 进行 RT-PCR,反应条件为 95 °C、10 min;95 °C、15 s,58 °C、1 min,40 个循环。成骨标志物 ALP、I 型胶原蛋白(collagen I, COL1)、Runx2、牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)、骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)、骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP) 和内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH) 的引物用引物设计软件 Primer Express 设计,RT-PCR 的引物序列见表 1。

1.7 Western blot 将 1×10^5 Vector-SHEDs 和 EfnB2-SHEDs 培养至 70% 融合度,成骨诱导培养基培养 6、12、24 h 后裂解离心,BCA 试剂盒检测蛋白浓度,10% SDS-PAGE 凝胶电泳转膜,一抗、二抗孵育。所用抗体:Ephrin B 兔抗人多克隆抗体、EphB4 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;磷酸化 Ephrin B 抗体、辣根过氧化物酶(HRP) 标记山羊抗小鼠 IgG 购自美国 Cell Signaling Technology 公司;抗 β-actin 鼠多克隆抗体购自美国 Bioworld Tech 公司。

1.8 免疫沉淀和免疫共沉淀试验 为分析 EphB4 的蛋白质磷酸化,将细胞用 -20 °C 预冷的含有蛋白

表 1 人类 ALP、BSP、COL1、Runx2、DSPP、
ephrinB2 基因 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
ALP	F: AGCCCTTCACTGCCATCCTGT R: ATTCTCTCGTTCACCGCCAC
COL1	F: GAGGGCCAAAGACGAAGACATC R: CAGATCACGTCATCGCACAAAC
Runx2	F: CTCCAACCCACGAATGCACTA R: GTGAGTGGGTGGCGGACATG
DSPP	F: GCAATGATGAATCTAATGGC R: CTGATTGCTGCTGCTTGTGAC
BSP	F: GCGAAGCAGAAGTGATGAAAC R: TGCCTCTGTGCTGTTGGTACTG
ephrinB2	F: CCTCTCTCAACTGTGCCAAA R: CCCAGAGGTTAGGCTGAATT
GAPDH	F: GGCATGGACTGTGGTCATGAG R: TGCACCACCAACTGCTTAGC

酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液裂解,解冻后样本二等分,加入 20 μl 蛋白 G 琼脂糖珠和 1 μg EphB4 抗体,4 °C 过夜。正常的兔 IgG 和鼠 IgG 用作对照组。免疫沉淀物用 RIPA 裂解液和 PBS 洗,100 °C 加热 3 min,10% 梯度 SDS-PAGE,转至 PVDF 膜,5% BSA/TBS/0.5% Tween 20 缓冲系统封闭液封闭,加入一抗磷酸化酪氨酸鼠单克隆抗体(4G10) 或 EphB4 兔抗,再分别加入二抗,HRP 标记山羊抗鼠 IgG 或山羊抗兔 IgG。HRP 发光法检测结果。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 20.0 进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析(ANOVA) 及 Tukey's post-hoc test 进行 3 组间实验数据的比较,用 *t* 检验进行两组间的数据比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SHEDs 的分化能力检测 流式细胞仪分析显示:提取的 SHEDs 高表达 CD73、CD90、CD105 等干细胞标志物,而 CD45 为低表达;20.8% 的 SHEDs 表达 STRO-1。见图 1A。另外,分离的 SHEDs 具有多向分化能力:成骨诱导实验组可见钙结节形成。见图 1B;成脂诱导实验组油红-O 染色可见脂滴形成。见图 1C;成神经诱导实验组可见 β-III 微管蛋白显著表达。见图 1D。

2.2 ephrinB2 转染 SHEDs Vector-SHEDs 组和 EfnB2-SHEDs 组 GFP 强表达,而在对照组 wild-type SHEDs 组中则没有检测出荧光信号。见图 2A。RT-PCR 结果显示:EfnB2-SHEDs 组的 ephrinB2 mRNA 表达量高于 Vector-SHEDs 组和 wild-type SHEDs 组

12 倍多 ($P < 0.05$)。见图 2B。Western blot 分析显示: EfnB2-SHEDs 组中 ephrinB2 的表达值高于 Vector-SHEDs 组和 wild-type SHEDs 组 ($P < 0.05$)。见图 2C。

2.3 实验组与对照组的细胞迁移能力及细胞增殖能力比较 与 wild-type SHEDs 组、Vector-SHEDs 组比较, EfnB2-SHEDs 组表现出明显增加的细胞迁移能力 ($P < 0.05$)。见图 3A。然而, 3 组在细胞增殖

方面差异无统计学意义 ($n = 6$), 见图 3B。

2.4 实验组与对照组的成骨分化 在诱导培养基中, 与 Vector-SHEDs 组比较, EfnB2-SHEDs 组显示出了更高的 ALP 活性和矿化能力 ($n = 4$)。见图 4。

2.5 实验组与对照组的成骨分化标志物的 mRNA 表达水平 RT-PCR 的结果显示: 在成骨诱导培养后 7、14、21d, EfnB2-SHEDs 组的 ALP、BSP、COL1 和 Runx2 的 mRNA 表达水平高于 Vector-SHEDs 组

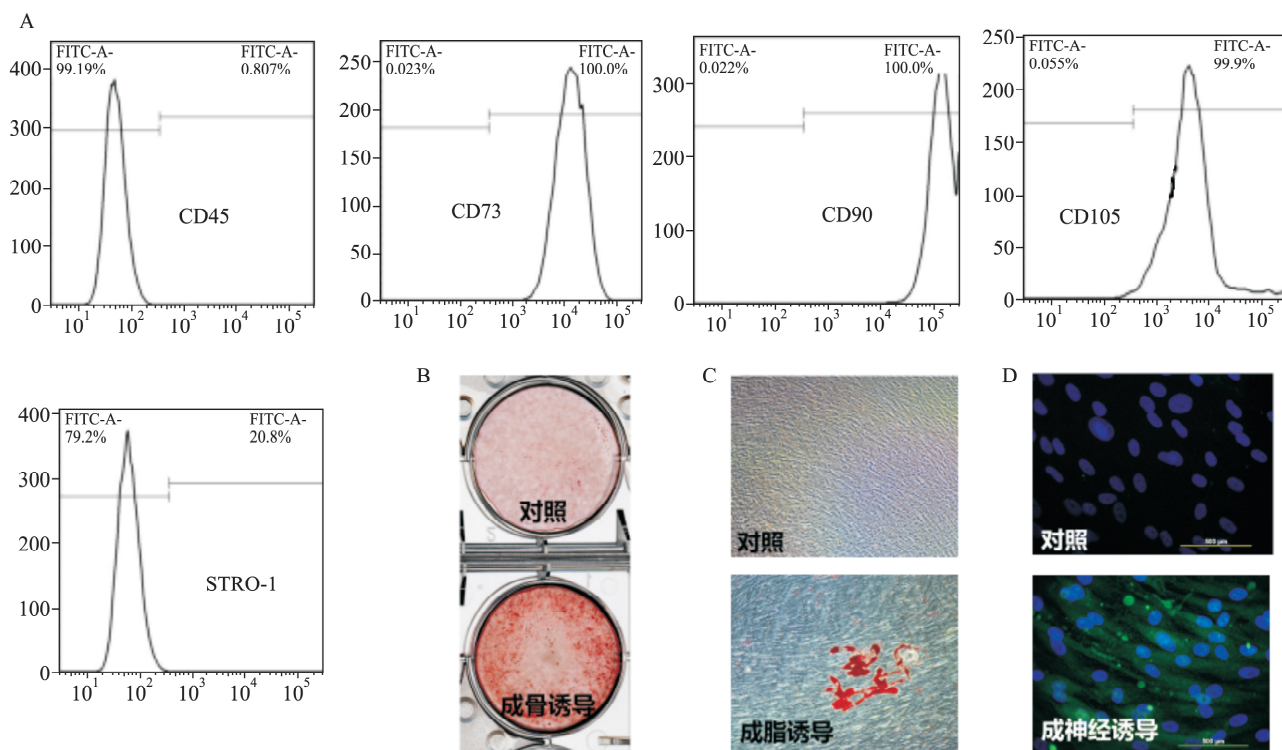


图1 SHEDs 的分化能力检测

A: 流式细胞仪分析 SHEDs 的表面抗原特征表型 CD45、CD73、CD90、CD105、STRO-1; B: 成骨诱导 4 周后的茜素红染色结果; C: 成脂诱导 3 周后油红 O 染色结果 $\times 10$; D: 成神经诱导 2 周后免疫荧光结果 $\times 100$

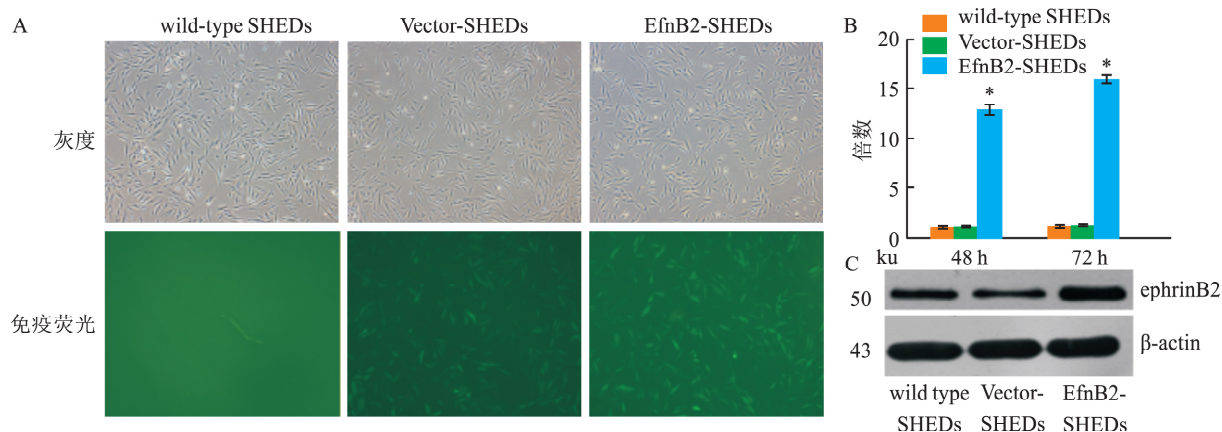


图2 对照组与实验组的转染结果比较

A: wild-type SHEDs 组、Vector-SHEDs 组、EfnB2-SHEDs 组的 GFP 表达; B: wild-type SHEDs 组、Vector-SHEDs 组、EfnB2-SHEDs 组的 ephrinB2 相对 mRNA 表达量; C: Western blot 分析 wild-type SHEDs 组、Vector-SHEDs 组、EfnB2-SHEDs 组的 ephrinB2 表达水平; 与 Wild-type SHEDs、Vector-SHEDs 比较: * $P < 0.05$

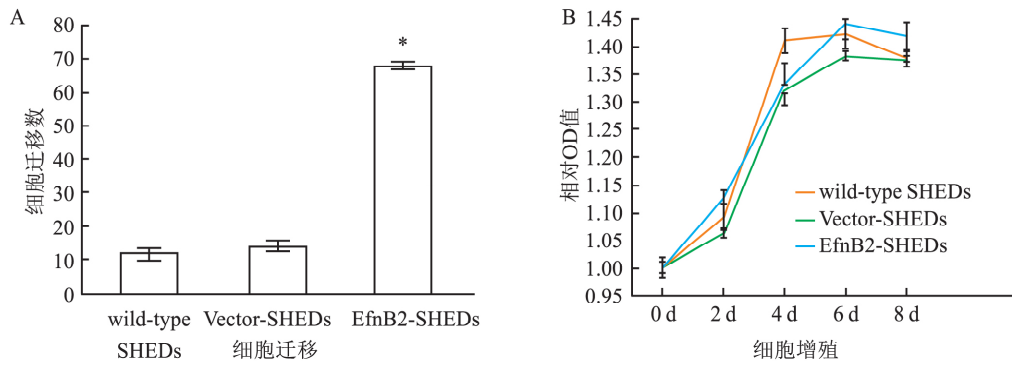


图3 wild-type SHEDs 组、Vector-SHEDs 组、EfnB2-SHEDs 组的细胞迁移和细胞增殖能力比较

A: wild-type SHEDs 组、Vector-SHEDs 组、EfnB2-SHEDs 组在细胞迁移实验中的相对细胞数; B: wild-type SHEDs 组、Vector-SHEDs 组、EfnB2-SHEDs 组在培养后 0、2、4、6、8 d 的相对 OD 值; 与 Wild-type SHEDs、Vector-SHEDs 比较: * $P < 0.05$

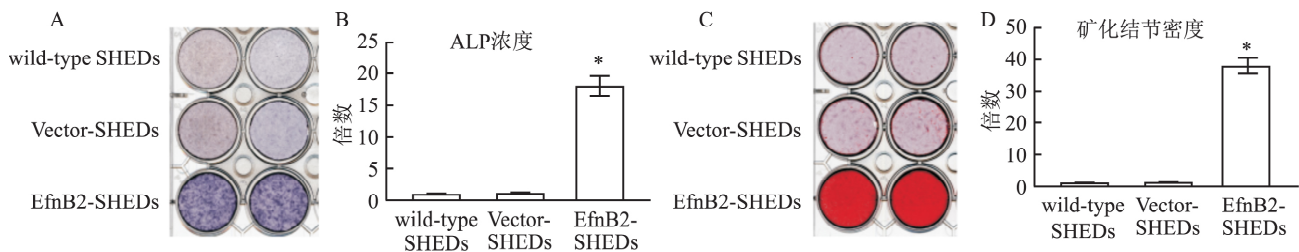


图4 wild-type SHEDs 组、Vector-SHEDs 组和 EfnB2-SHEDs 组的成骨分化

A、C: wild-type SHEDs 组、Vector-SHEDs 组、EfnB2-SHEDs 组在培养后 14 d 时 ALP 染色及 18 d 时茜素红染色; B、D: wild-type SHEDs 组、Vector-SHEDs 组和 EfnB2-SHEDs 组的相对 ALP 密度和相对矿化结节密度; 与 Wild-type SHEDs、Vector-SHEDs 比较: * $P < 0.05$

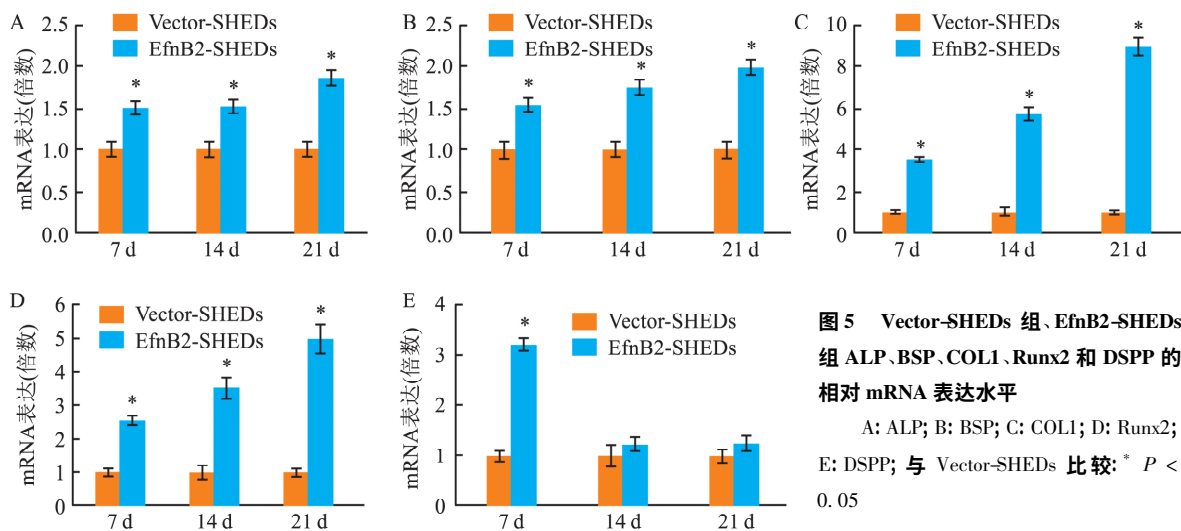


图5 Vector-SHEDs 组、EfnB2-SHEDs 组 ALP、BSP、COL1、Runx2 和 DSPP 的相对 mRNA 表达水平

A: ALP; B: BSP; C: COL1; D: Runx2; E: DSPP; 与 Vector-SHEDs 比较: * $P < 0.05$

($P < 0.05$)。见图 5A ~ D。EfnB2-SHEDs 组 DSPP 的 mRNA 表达在 7 d 时高于 Vector-SHEDs 组 ($P < 0.05$),但在 14 d 和 21 d 时差异无统计学意义。见图 5E。

2.6 实验组和对照组 EphrinB2/EphB4 的蛋白质磷酸化 当用 EphB4-Fc 来刺激 Vector-SHEDs 组和 EfnB2-SHEDs 组时, EfnB2-SHEDs 组比 Vector-

SHEDs 组表现出更高的磷酸化水平。见图 6A。当 EfnB2-SHEDs 组和 Vector-SHEDs 组在成骨诱导培养基中培养时, ephrinB2 的磷酸化水平在 6 h 时开始升高, 12 h 时达到最高。见图 6B。EfnB2-SHEDs 组在 12 h 发生 EphB4 酪氨酸磷酸化, 24 h 达到最高值。见图 6C。在 12 h 和 24 h, 免疫共沉淀试验证实 ephrinB2 与 EphB4 之间发生了直接反应。见图 6D。

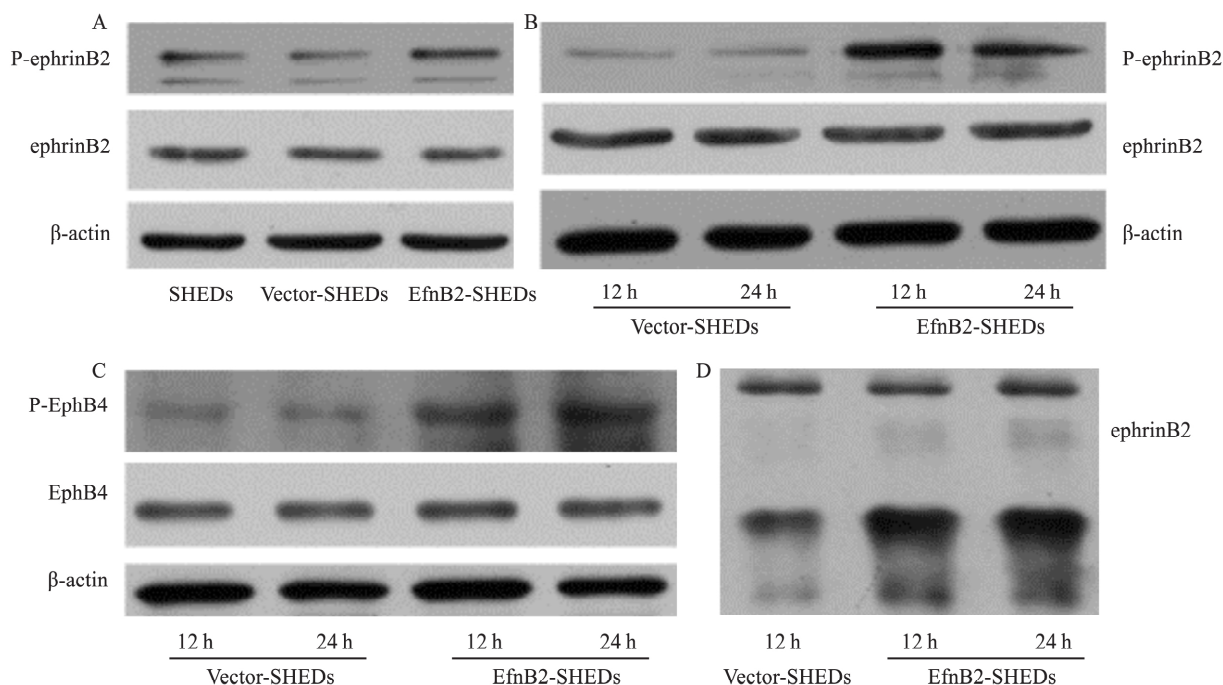


图6 Vector-SHEDs 组和 EfnB2-SHEDs 组 ephrinB2 和 EphB4 的蛋白质磷酸化

A: EphB4-Fc 的刺激使 EfnB2-SHEDs 组表现出更高的磷酸化水平; B: 成骨诱导培养基中的 ephrinB2 磷酸化在 12 h 时达高峰; C: Vector-SHEDs 组和 EfnB2-SHEDs 组在成骨培养基中的 EphB4 蛋白磷酸化; D: 免疫共沉淀显示成骨培养基中 Vector-SHEDs 组和 EfnB2-SHEDs 组 12 h 和 24 h 时不同的 ephrinB2 表达水平

3 讨论

当牙齿或者牙槽骨受到损伤或破坏后,牙齿或牙槽骨能够通过干细胞、生物支架及活性因子之间的相互作用来完成对损伤的修复^[9]。通过移植基因转染的干细胞将形态发生因子、生长因子和抗炎因子等输送到目的位点的方法为组织修复与再生提供了新的思路^[4-5]。基因转染 ephrinB2 能够诱导间充质干细胞的成骨分化^[9],成牙本质细胞系和成骨细胞系密切相关,SHEDs 也是间充质干细胞的一个亚型,因此,eph rinB2 及其同源受体 EphB4、EphB2 可能在 SHEDs 的成骨/成牙本质分化中发挥了相似的作用。

间充质干细胞、成骨细胞和 SHEDs 表面都表达 EphB4 受体及其同源配体。本研究通过基因转染技术上调 SHEDs 自身的 EfnB2 表达水平,结果显示不论是基因水平还是蛋白水平,eph rinB2 基因转染 SHEDs (EfnB2-SHEDs) 表现出显著的 eph rinB2 表达上调。与 Vector-SHEDs 组比较,EfnB2-SHEDs 组表现出更强的迁移能力。另外,在成骨诱导条件下培养时,EfnB2-SHEDs 组能形成更多的矿化结节并展现出明显增加的多种成骨基因(包括 ALP、COL1、

RunX2、BSP 和 DSPP) 的表达。

本研究进一步探讨了 eph rinB2 与其同源配体之间的作用机制。首先,对 SHEDs 进行了 21 d 的成骨/成牙本质诱导培养,然后检测其 eph rinB2、EphB2、EphB4 内源性表达水平的变化。RT-PCR 结果显示,在诱导培养过程中,Eph rinB2 及其同源受体 EphB2 和 EphB4 的表达水平有显著的改变,并且这一结论也被 Western blot 结果所佐证。这就证实了这些细胞表面受体分子的确在 SHEDs 的成骨/成牙本质分化过程中发挥了作用。其次用 EphB4-Fc 重组蛋白来刺激 Vector-SHEDs 组和 EfnB2-SHEDs 组时,EfnB2-SHEDs 组比 Vector-SHEDs 组表现出更高的磷酸化水平。当 EfnB2-SHEDs 组和 Vector-SHEDs 组在成骨诱导培养基中培养时,eph rinB2 的磷酸化水平在 6 h 时开始升高,12 h 时达到最高。EfnB2-SHEDs 组在 12 h 发生 EphB4 酪氨酸磷酸化,24 h 达到最高值。12 h 和 24 h 的免疫共沉淀试验显示 eph rinB2 与 EphB4 发生了相互作用,同时出现了正向和反向信号传导^[9]。eph rinB2 反向信号在骨重建中发挥了很多的关键作用,比如:通过与破骨细胞前体细胞中的核因子 κ B 受体活化因子相互作用来调控核因子 κ B 受体活化因子配体的表达以促进

骨吸收和破骨细胞形成;通过抑制成骨细胞凋亡来促进成骨细胞的持续分化;以及维持成骨细胞和骨细胞蛋白的表达以调控新形成的骨基质的矿化^[3]。尽管在 SHEDs 中的 ephrinB2 反向信号途径还不清楚,但是 ephrinB2 与 EphB4、EphB2 对邻近细胞的相互作用最终激活了 EphB4、EphB2 的正向信号途径,从而促进了成骨分化^[6-7]。本研究中,efrinB2 在 SHEDs 中的过表达并没有促进 EphB4 的过表达,而是促进了 EphB4 的磷酸化。被 ephrinB2 触发的 EphB4 正向信号途径导致了成骨细胞中的早期成骨转录因子 Runx2 及其下游目标 ALP 的 Ras-和细胞外信号调节激酶 1/2 - 依赖型的激活^[8]。

本研究表明 ephrinB2 及其同源受体在 SHEDs 的成骨/成牙本质分化中发挥了重要的作用,efrinB2/EphB4 信号通路参与了 SHEDs 成骨/成牙本质分化的过程。系统性研究这些表面受体分子在 SHEDs 成骨/成牙本质分化中的作用将有助于进一步研究活性因子是如何促进 SHEDs 分化为成骨细胞/成牙本质细胞以完成组织修复的。

参考文献

- [1] Liu J, Yu F, Sun Y, et al. Concise reviews: characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cell [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(3): 627 - 38.
- [2] Tierney E G, McSorley K, Hastings C L, et al. High levels of ephrinB2 overexpression increases the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and promotes enhanced cell mediated mineralisation in a polyethyleneimine-efrinB2 gene-activated matrix [J]. *J Control Release*, 2013, 165: 173 - 82.
- [3] Lin Z, Rios H F, Cochran D L. Emerging regenerative approaches for periodontal reconstruction: a systematic review from the AAP regeneration workshop [J]. *J Periodontol*, 2015, 86 (2 Suppl): 134 - 52.
- [4] Heng B C, Wang S, Gong T, et al. EphrinB2 signaling enhances osteogenic/odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells [J]. *Arch Oral Biol*, 2018, 87: 62 - 71.
- [5] Toda H, Yamamoto M, Uyama H, et al. Effect of hydrogel elasticity and ephrinB2-immobilized manner on Runx2 expression of human mesenchymal stem cells [J]. *Acta Biomater*, 2017, 58: 312 - 22.
- [6] Tonna S, Takyar F M, Vrahnas C, et al. EphrinB2 signaling in osteoblasts promotes bone mineralization by preventing apoptosis [J]. *FASEB J*, 2014, 28(10): 4482 - 96.
- [7] Takyar F M, Tonna S, Ho P W, et al. EphrinB2/EphB4 inhibition in the osteoblast lineage modifies the anabolic response to parathyroid hormone [J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(4): 912 - 25.
- [8] Zhu S Y, Wang P L, Liao C S, et al. Transgenic expression of ephrinB2 in periodontal ligament stem cells (PDLSCs) modulates osteogenic differentiation via signaling crosstalk between ephrinB2 and EphB4 in PDLSCs and between PDLSCs and pre-osteoblasts within co-culture [J]. *J Periodontal Res*, 2017, 52(3): 562 - 73.

Transgenic expression of ephrinB2 in stem cells from human exfoliated deciduous teeth enhances osteogenic differentiation

Hu Xiaoyan¹, Zhu Shaoyue², Xu Jianguang¹, et al

(¹Stomatology College of Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Lab. of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032;

²Affiliated Xuzhou Stomatological Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002)

Abstract Objective To investigate the role of ephrinB2/EphB4 signaling in the osteogenic/odontogenic differentiation of SHEDs via over-expression ephrinB2 in SHEDs. **Methods** SHEDs were isolated from exfoliated deciduous teeth and transfected with hEfnB2-GFP-Bsd (GFP-Bsd as empty Vector). The transfected SHEDs were then induced into osteo-/odontoblasts under special differentiation medium. RT-PCR, Alizarin-red S staining, and ALP assay were used to analyze the effect of osteogenic/odontogenic differentiation of EfnB2-SHEDs and Vector-SHEDs. The phosphorylated protein expression level of ephrinB2 and EphB4 were invested via Western blot, immunoprecipitation assays and co-immunoprecipitation assays. **Results** Compared with Vector-SHEDs, EfnB2-SHEDs possessed higher ALP activity and mineralization capacity. The odonto-/osteogenic genes expression were significantly enhanced in EfnB2-SHEDs group, and the activity of EphB4 receptor was triggered through phosphorylation in odonto-/osteogenic differentiation. **Conclusion** Our study shows that the odonto-/osteogenic differentiation of SHEDs can be improved through stimulation of the phosphorylation of ephrinB2/Ephb4.

Key words SHEDs; ephrinB2; gene transfection; osteogenic differentiation