

· 纳米生物材料用于组织修复重建 · 实验研究 ·

浓缩生长因子联合矿化胶原材料对 BMSCs 黏附、增殖和成骨分化的影响及体内成骨效应



张月, 刘克达, 闫明, 王蔚

中国医科大学口腔医学院附属口腔医院综合科 辽宁省口腔疾病重点实验室(沈阳 110002)

【摘要】 目的 探讨浓缩生长因子(concentrated growth factor, CGF)联合矿化胶原(mineralized collagen, MC)材料对 BMSCs 黏附、增殖和分化的影响及其体内成骨效应,为 CGF 和 MC 材料在骨缺损修复中的联合应用提供理论依据。方法 取健康志愿者静脉血制成 CGF,然后制备 CGF 提取液(CGF extracts, CGFe)。体外实验:取人 BMSCs(human BMSCs, hBMSCs)分为 4 组, A、B、C 组分别用含 2%、5%、10%CGFe 的 α -MEM 培养基(含 10%FBS 和 1% 双抗)培养; D 组用不含 CGFe 的 α -MEM 培养基(含 10%FBS 和 1% 双抗)培养。扫描电镜观察 CGFe 对细胞黏附的影响,细胞计数试剂盒 8(cell counting kit 8, CCK-8)法检测 CGFe 对细胞增殖的影响,成骨诱导后行 ALP 活性检测及 Western blot 检测骨桥蛋白(osteopontin, OPN)表达。体内实验:取 18 只新西兰大耳兔,左、右侧下颌骨分别制备圆形骨缺损模型;分别植入自体静脉血制备的 CGF 凝胶+MC 材料(体积比 1:1, 实验组)和单纯 MC 材料(对照组)。术后 4、8、12 周分别处死 6 只兔取材,行 Micro-CT 扫描观察体内新骨形成及材料降解情况。结果 体外实验:扫描电镜观察示 A、B、C 组细胞在 MC 材料上铺展情况优于 D 组,伪足较多;CCK-8 法检测示不同浓度 CGFe 均能促进 MC 材料上细胞增殖,培养 2、3、5、7 d 细胞吸光度(A)值 C 组>B 组>A 组>D 组($P<0.05$);ALP 活性检测示其活性与成骨诱导时间和 CGFe 浓度成正比($P<0.05$);成骨诱导培养 14 d Western blot 检测示 A、B、C 组 OPN 蛋白相对表达量显著高于 D 组,且 CGFe 浓度越高,OPN 蛋白相对表达量越高($P<0.05$)。体内实验:Micro-CT 观察示术后 4、8、12 周实验组新骨形成、材料降解均优于对照组。定量检测示,各时间点实验组新生骨体积、新生骨体积百分比、骨小梁数、骨小梁厚度均显著高于对照组,材料剩余体积、材料剩余体积百分比、骨小梁分离均显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 CGF 能有效促进 MC 材料上 BMSCs 的黏附、增殖及成骨分化,其中 10%CGFe 效果最显著。CGF 和 MC 材料联合应用可显著促进体内成骨。

【关键词】 浓缩生长因子;矿化胶原;BMSCs;成骨分化

Effect of concentrated growth factor combined with mineralized collagen material on the adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells and the osteogenic effect *in vivo*

ZHANG Yue, LIU Keda, YAN Ming, WANG Wei

Comprehensive Department, School and Hospital of Stomatology, China Medical University, Liaoning Provincial Key Laboratory of Oral Diseases, Shenyang Liaoning, 110002, P.R.China

Corresponding author: WANG Wei, Email: wwang75@cmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects of concentrated growth factor (CGF) combined with mineralized collagen (MC) materials on the adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and their osteogenic effects *in vivo*, and to provide a theoretical basis for the combined application of CGF and MC materials in bone defect regeneration and repair. **Methods** CGF was prepared from venous blood of healthy

DOI: 10.7507/1002-1892.202009070

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81970980);沈阳市中青年科技创新人才支持计划项目(RC200060);辽宁省重点研究计划指导计划项目(2018225078);辽宁省自然科学基金指导项目(2019-ZD-0749);沈阳市重大科技创新研发计划(19-112-4-027)

通信作者:王蔚, Email: wwang75@cmu.edu.cn

volunteers, and then CGF extracts (CGFe) were prepared. *In vitro* experiment: human BMSCs (hBMSCs) were divided into 4 groups. Groups A, B, and C were cultured with α -MEM medium [containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% double antibody] containing 2%, 5%, and 10%CGFe, respectively; group D was cultured with α -MEM medium (containing 10%FBS and 1% double antibody) without CGFe. Scanning electron microscopy was used to observe the effect of CGFe on cell adhesion. Cell counting kit 8 (CCK-8) was used to detect the effect of CGFe on cell proliferation. After osteogenic induction, alkaline phosphatase (ALP) activity was detected and Western blot was performed to detect osteopontin (OPN) expression. *In vivo* experiment: Eighteen New Zealand big-eared rabbits were used to prepare circular bone defect models on the left and right mandibles, and implant CGF gel (prepared from autologous venous blood)+MC material (volume ratio 1 : 1, experimental group) and simple MC material (control group), respectively. At 4, 8, and 12 weeks after operation, 6 rabbits were sacrificed respectively to obtain materials, and Micro-CT scanning was performed to observe the formation of new bone and material degradation *in vivo*. **Results** *In vitro* experiments: Scanning electron microscopy showed that the cells of groups A, B, and C spread better on MC materials than group D, with more pseudopodia. CCK-8 method showed that different concentrations of CGFe could promote cell proliferation, and the absorbance (A) value of cells cultured for 2, 3, 5, and 7 days was in the order of group C>group B>group A>group D, the differences were significant ($P<0.05$). ALP activity test showed that its activity was proportional to the osteogenic induction time and CGFe concentration ($P<0.05$). Western blot analysis of osteogenic induction culture for 14 days showed that the relative expression of OPN protein in groups A, B, and C was significantly higher than that in group D, and the higher the CGFe concentration, the higher the relative expression of OPN protein ($P<0.05$). *In vivo* experiment: Micro-CT observation showed that the new bone formation and material degradation of the experimental group were better than those of the control group at 4, 8, and 12 weeks after operation. Quantitative detection showed that the volume of new bone volume, new bone volume fraction, trabeculae number, and trabecular thickness of the experimental group were significantly higher than those of the control group at each time point, the residual material volume, residual material volume fraction, and trabecular separation were significantly lower than those of the control group, all showing significant differences ($P<0.05$). **Conclusion** CGF can effectively promote the adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of BMSCs on MC materials, and 10%CGFe has the most significant effect. The combined application of CGF and MC material can significantly promote bone formation *in vivo*.

【Key words】 Concentrated growth factor; mineralized collagen; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81970980); Shenyang Young and Middle-aged Technological Innovation Talent Plan (RC200060); Liaoning Provincial Key Research Plan Guidance Project (2018225078); Liaoning Provincial Natural Science Foundation Guidance Project (2019-ZD-0749); Shenyang Major Scientific and Technological Innovation Research and Development Plan (19-112-4-027)

肿瘤、骨髓炎、先天畸形和外伤等均可导致骨缺损, 骨缺损的再生修复是近年临床研究热点^[1]。随着材料学和骨组织工程领域的发展, 复合多种高分子的人工骨材料可以满足多种临床需求^[2]。矿化胶原 (mineralized collagen, MC) 材料是一种优良的人工骨替代材料, 通过仿生学技术在体外矿化制备而成, 可以根据临床需要制备不同规格和形状^[3-4]。MC 材料可广泛应用于颅骨、颌骨及四肢骨等部位骨缺损修复、脊柱融合手术、牙周组织再生等方面。作为较理想的支架材料, MC 材料具有多孔结构和良好生物学特性, 可为细胞黏附、生长和分化提供稳定支持, 有利于新生骨组织形成^[5]。

浓缩生长因子 (concentrated growth factor, CGF) 是新一代血小板浓缩提取物, 它通过变速离

心, 最大程度激活血小板, 富集到高浓度生长因子 (包括 PDGF、TGF- β 、IGF、VEGF、EGF、BMPs 等) 并将它们缓慢释放出来, 从而起到促进组织再生等作用^[6-7]。将 CGF 单独或与植骨材料联合应用于美容、烧伤治疗以及骨增量或骨缺损修复 (如口腔种植手术)、慢性骨髓炎等外科手术中, 已得到临床广泛认可^[8-13]。

为了更好地修复骨缺损, 提高细胞在 MC 材料上的黏附、增殖活性, 加快新生骨组织沉积速度, 本研究拟将 CGF 与 MC 材料联合应用于骨组织工程中, 但两者以何种比例混合可达最佳效果尚不明确。因此, 本研究制取 CGF 提取液 (CGF extracts, CGFe), 通过相关检测探究不同浓度 CGFe 对 MC 材料上人 BMSCs (human BMSCs, hBMSCs) 黏附、

增殖及成骨分化的影响,并将两者复合物植入兔下颌骨缺损模型观察新骨形成情况,以期 CGF 和 MC 材料在骨缺损修复再生中的联合应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料、动物及主要试剂、仪器

hBMSCs (北京裕恒丰有限公司); MC 材料 (北京奥精科技有限公司)。健康 7~12 月龄新西兰大耳兔 18 只,体质量 (3.5±0.5) kg,雌雄不限,由青岛康大生物科技有限公司提供。

α -MEM 培养液 (HyClone 公司,美国); FBS (Serapro 公司,美国); 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit 8, CCK-8)、RIPA 裂解液、BCA 试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); ALP 活性试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 小鼠抗人骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 抗体、Alexa Fluor 564 标记山羊抗小鼠二抗 (Abcam 公司,美国); β -tubulin 抗体 (Affinity 公司,美国); 5 \times 蛋白上样缓冲液 (北京康为世纪生物科技有限公司); SDS-PAGE 凝胶试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司)。MultiskanMS-352 酶标定量测试仪 (Tecan 公司,瑞士); IX50 倒置相差显微镜及照相系统 (Olympus 公司,日本); Forma steri-cycle 371 培养箱 (Thermo 公司,美国); S4800 扫描电镜 (Hitachi 公司,日本); CGF 血纤维蛋白离心机 (Medifuge 公司,意大利); Tanon SDS-PAGE 蛋白电泳仪 (上海天能科技有限公司)。Microview 软件 (GE Healthcare BioSciences 公司,美国)。

1.2 MC 材料表面形貌观察

采用扫描电镜观察 MC 材料表面多孔形貌,并测量材料孔径和计算孔隙率。

1.3 CGF 的获取

筛选 10 名志愿者,年龄 20~30 岁,心、肝、肾功能正常,血常规正常,无乙肝表面抗原阳性、丙肝、梅毒、免疫系统疾病、代谢性疾病等,近期无感冒。提前设定好 CGF 制备程序^[14],抽取志愿者静脉血 9 mL,立即放入离心机转筒中,对侧配平保证转子平衡,变速离心 (2 400~3 000 r/min) 12 min,得到 CGF 凝胶。

1.4 体外实验

1.4.1 CGFe 的制备 在超净工作台内,用镊子去掉 CGF 凝胶上的红细胞,然后放入无菌离心管中,用研磨棒研磨凝胶,挤出 CGF 渗出液;再用剪刀剪碎组织块,置于-80℃冰冻 1 h,4℃冰箱解冻后

用高速搅拌器搅拌,室温下以 3 000 \times g 离心 8 min,取上清,即为 CGFe。超净台内用 0.22 μ m 滤器过滤后分装于-20℃冰箱保存,避免反复冻融^[13]。

1.4.2 实验分组 取 hBMSCs 分为 4 组,A、B、C 组分别用含 2%、5%、10%CGFe 的 α -MEM 培养基 (含 10%FBS 和 1% 双抗) 培养; D 组用不含 CGFe 的 α -MEM 培养基 (含 10%FBS 和 1% 双抗) 培养。各组所用含 CGFe 的培养基均为在含 10%FBS 培养基基础上再加 CGFe。

1.4.3 CGFe 对细胞黏附的影响 将各组细胞悬液按照 2 \times 10⁴ 个/孔密度接种于 MC 材料表面,置于 24 孔板中,每组设 3 个复孔。培养 24 h 后吸去培养液,4℃以 2.5% 戊二醛固定 3 h,梯度乙醇脱水,空气中干燥,喷金,扫描电镜观察。

1.4.4 CGFe 对细胞增殖的影响 将各组细胞悬液按照 4 \times 10⁴ 个/孔密度接种至 MC 材料表面,置于 24 孔板中,每组每个时间点设 3 个复孔。培养 1、2、3、5、7 d 后,每孔添加 100 μ L CCK-8 试剂,继续培养 1 h,每孔吸取 110 μ L 反应液于 96 孔板中。根据 CCK-8 试剂盒说明书操作,于 450 nm 波长下测定各孔吸光度 (A) 值。

1.4.5 ALP 活性检测 将各组细胞悬液按照 4 \times 10⁴ 个/孔密度接种至 MC 材料表面,置于 24 孔板中,每组每个时间点设 3 个复孔,每 3 天换液。每组细胞分别采用成骨诱导培养液 (含 50 mg/L 维生素 C、10 nmol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、10%FBS 的 α -MEM 培养基) 诱导培养,5、7、14 d 后吸去培养液,PBS 轻柔清洗 3 次,加入 500 μ L 0.1% Triton X-100,4℃、12 000 r/min 离心 5 min。收集上清液,用 BCA 法测定蛋白浓度,根据 ALP 检测试剂盒说明书操作并计算各组 ALP 活性。

1.4.6 Western blot 检测 OPN 蛋白表达 各组细胞同 1.4.5 方法成骨诱导培养 14 d 后,用 RIPA 提取细胞总蛋白,BCA 法进行蛋白定量。取 35 μ g 细胞总蛋白溶液与 5 \times SDS 加样缓冲液混匀,100℃加热 5 min 使蛋白变性,加样于 10%SDS-PAGE 凝胶中,电泳 80 V、30 min,100 V、1 h,再将蛋白质电转移至硝酸纤维素膜上;硝酸纤维素膜用 5% 脱脂牛奶室温下封闭 1 h,PBST 洗膜 5 min \times 1 次;用小鼠抗人 OPN 抗体 (1:1 000) 孵育过夜,PBST 洗膜 5 min \times 3 次;用山羊抗小鼠抗体 (1:10 000) 孵育 1 h,PBST 洗膜 10 min \times 3 次。扫描成像,用 Image master VDS 成像分析系统进行灰度值检测,以 OPN 蛋白和内参蛋白 β -tubulin 的灰度值比值作为 OPN 蛋白相对表达量。



1.5 体内实验

取 18 只新西兰大耳兔，耳缘静脉注射 20% 乌拉坦 (5 mL/kg) 麻醉后，抽取 9 mL 静脉血同前法离心得到 CGF 凝胶。于双侧下颌骨体部下缘 5 mm 作一长 2~3 cm 平行切口，暴露骨面；左、右侧下颌骨使用中空取骨钻分别制备一直径 8 mm、深 4 mm 的圆形骨缺损区；左、右侧骨缺损区分别植入 0.1 mL CGF 凝胶+0.05 g MC 材料 (体积比 1:1, 实验组) 和 0.1 g 单纯 MC 材料 (对照组)。

术后 4、8、12 周分别取 6 只兔，采用空气栓塞法处死，取材，行 Micro-CT 扫描观察体内新骨形成及材料降解情况。通过 Microview 软件对 Micro-CT 观察结果进行三维重建分析，计算新生骨体积 (new bone volume, BV)、新生骨体积百分比 (new bone volume fraction, BV/TV)、骨小梁数 (trabecular number, Tb.N)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁分离 (trabecular separation, Tb.Sp) 及材料剩余体积 (residual material volume, MV)、材料剩余体积百分比 (residual material volume fraction, MV/TV)。

1.6 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。数据以均数±标准差表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 检验；检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MC 材料表面形貌观察

MC 材料表面粗糙，疏松有孔。扫描电镜观察示材料呈三维立体多孔网状分层结构，含有大量孔径大小不一 (50~500 μm) 的孔隙，孔隙之间相互广泛交通，孔隙率>70%。见图 1。

2.2 体外实验

2.2.1 CGFe 对细胞黏附的影响 培养 24 h 扫描电镜观察示，各组材料表面均有基质样物质黏附，材料表面及孔隙内均有细胞长入，细胞呈多角形、长梭形铺展，伸出伪足与材料相连。其中 D 组细胞铺展良好，伸出较少、较短的伪足；A、B、C 组细胞伸出的伪足较 D 组多且长，深入孔隙中与材料相连，细胞铺展范围大，呈三角形和梭形。见图 2。

2.2.2 CGFe 对细胞增殖的影响 各组细胞增殖曲线均呈 S 形，A、B、C 组细胞培养 2 d 进入对数生长期，D 组 3 d 开始快速增长，各组于 5 d 后进入平台期。培养 2、3、5、7 d 时，A、B、C 组细胞 A 值显著大于 D 组，C 组大于 A、B 组，B 组大于 A 组，差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 3。

2.2.3 ALP 活性检测 随成骨诱导时间延长，各组 ALP 活性均逐渐增高。5、7、14 d 时 A、B、C 组 ALP 活性均显著高于 D 组，7、14 d 时 C 组显著高于 A、B 组，B 组高于 A 组，差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 4。

2.2.4 Western blot 检测 OPN 蛋白表达 成骨诱导培养 14 d，A、B、C、D 组 OPN 蛋白相对表达量分别为 0.54 ± 0.01 、 0.56 ± 0.03 、 0.60 ± 0.01 、 0.38 ± 0.01 ，各组间比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 5。

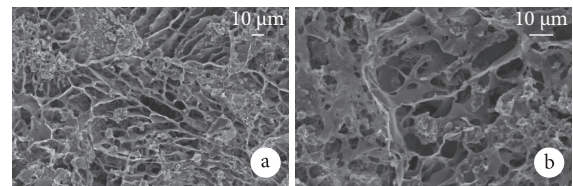


图 1 MC 材料扫描电镜观察 a. $\times 500$; b. $\times 1\ 000$

Fig.1 Scanning electron microscopy observation of MC material a. $\times 500$; b. $\times 1\ 000$

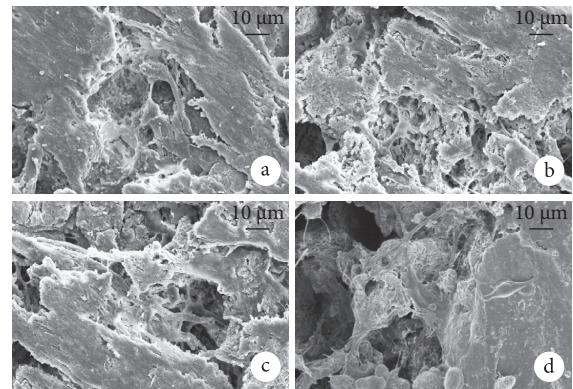


图 2 各组培养 24 h 扫描电镜观察 ($\times 1\ 000$) a. A 组; b. B 组; c. C 组; d. D 组

Fig.2 Scanning electron microscopy observation of each group cultured for 24 hours ($\times 1\ 000$) a. Group A; b. Group B; c. Group C; d. Group D

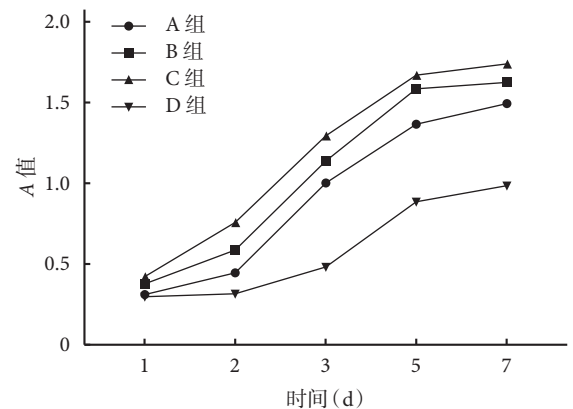


图 3 CCK-8 法检测各组各时间点细胞增殖情况

Fig.3 CCK-8 method to detect cell proliferation at each time point in each group

2.3 体内实验

Micro-CT 观察示, 随时间延长, 两组体内材料逐渐降解而新生骨量不足, 至 12 周时骨缺损仍未完全愈合; 但各时间点实验组骨缺损修复情况明显优于对照组。见图 6、7。

定量分析显示, 随时间延长, 两组 BV、BV/TV、Tb.N、Tb.Th 均逐渐增加, 而 MV、Tb.Sp、MV/TV 均逐渐减少。各时间点实验组 BV、BV/TV、Tb.N、Tb.Th 均显著高于对照组, MV、

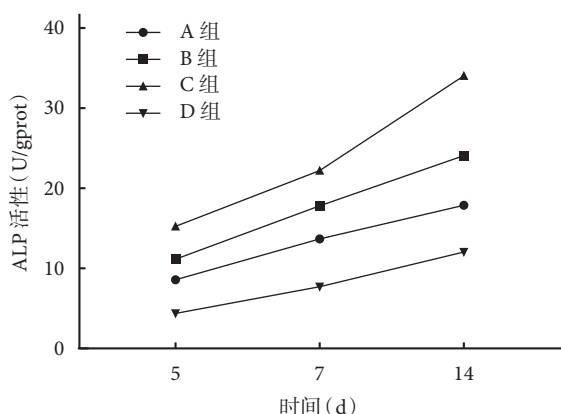


图 4 各组成骨诱导各时间点 ALP 活性检测

Fig.4 Detection of ALP activity at each time point of osteogenic induction

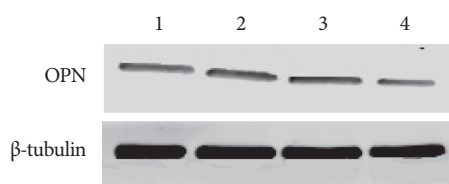


图 5 成骨诱导培养 14 d Western blot 检测各组 OPN 蛋白表达 1: C 组 2: B 组 3: A 组 4: D 组

Fig.5 Western blot detection of OPN protein expression in each group after osteogenic induction cultured for 14 days 1: Group C 2: Group B 3: Group A 4: Group D

Tb.Sp、MV/TV 均显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 8。

3 讨论

MC 材料是一种类似人体骨等级分层结构的三维多孔骨移植材料^[4], 包括充填仿生骨、骨粉、骨水泥、海绵充填塞和引导骨再生膜等多种规格形式, 同时具有可塑性, 可满足临床不同需要^[15]。其作为优良植骨材料, 具备良好的机械性能, 与天然骨组织相似, 可以满足生物所需机械强度和弹性模量; 具备生物相容性, 为成骨活动提供良好微环境, 有利于细胞黏附、生长; 具备优良的骨传导性和骨诱导性, 其三维多孔结构间孔隙相互连通, 利于细胞和血管长入, 促进 BMSCs 趋化和分化, 生成钙基质和胶原, 从而利于新生骨沉积; 具有生物降解性, 材料植入机体后在新生骨沉积同时发生吸收改建, 且新生骨形成和材料改建速率相协调。MC 材料符合理想骨支架材料基本要求, 能够促进人 MSCs 成骨分化, 利于骨组织再生修复, 在临床中的应用逐渐增多^[5]。

目前临床中血小板制品主要包括富血小板血浆、富血小板纤维蛋白 (platelet rich fibrin, PRF) 以及 CGF。PRF 是第 2 代血小板浓缩物, 能提供丰富的自体细胞因子和生长因子, 可作为一种新型生物材料应用于临床^[16]。CGF 制作原理与 PRF 相似, 但不添加凝血酶等生物制剂, 有效模拟了生理性凝血过程, 同时通过改变离心转速 (2 400 ~ 2 700 r/min) 促进纤维蛋白缓慢聚合, 激活血小板, 从而富集到相对前 2 代血小板浓缩物浓度更高的生长因子^[11, 17]。同时, CGF 纤维蛋白凝胶一方面具有致密的纤维网状结构, 可以为细胞等提供良好生物支撑, 诱导新生组织形成; 另一方面, 有研究认为 CGF 内血小

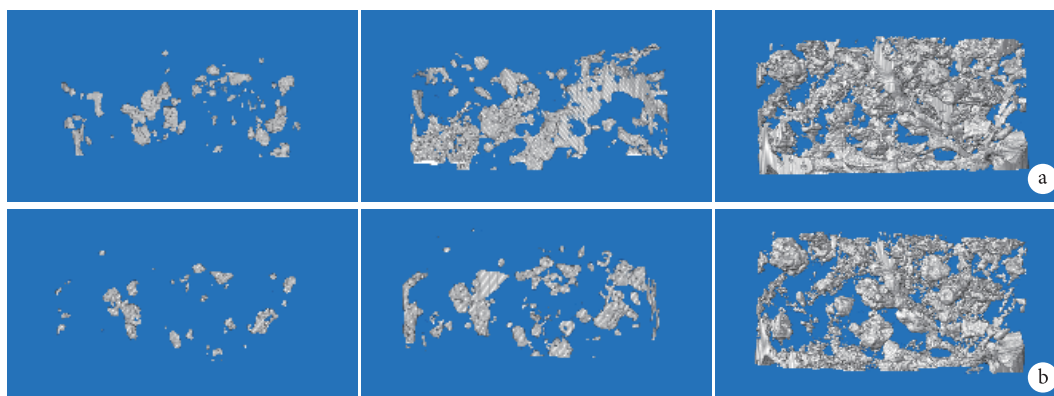


图 6 术后各时间点 Micro-CT 扫描观察两组体内新骨形成情况 从左至右分别为术后 4、8、12 周 a. 实验组; b. 对照组

Fig.6 Micro-CT scanning at each time point after operation to observe the formation of new bone in the two groups From left to right for 4, 8, and 12 weeks after operation, respectively a. Experimental group; b. Control group

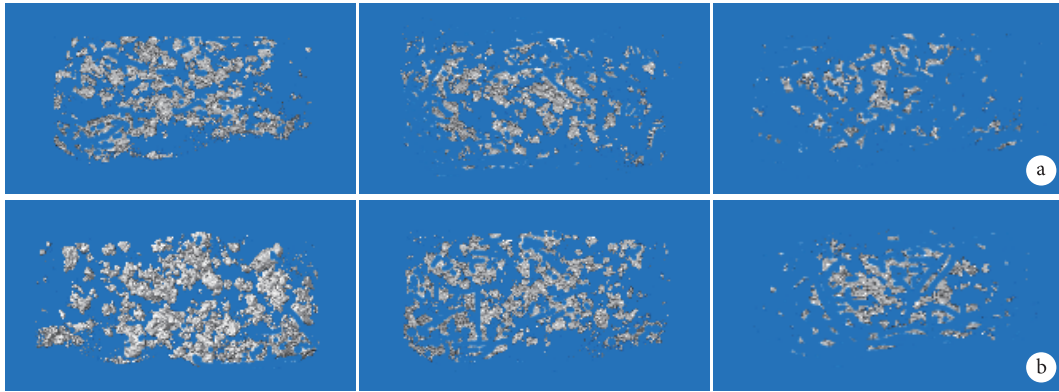


图7 术后各时间点 Micro-CT 扫描观察两组体内材料降解情况 从左至右分别为术后 4、8、12 周 a. 实验组; b. 对照组

Fig.7 Micro-CT scanning at each time point after operation to observe the degradation of the materials in the two groups From left to right for 4, 8, and 12 weeks after operation, respectively a. Experimental group; b. Control group

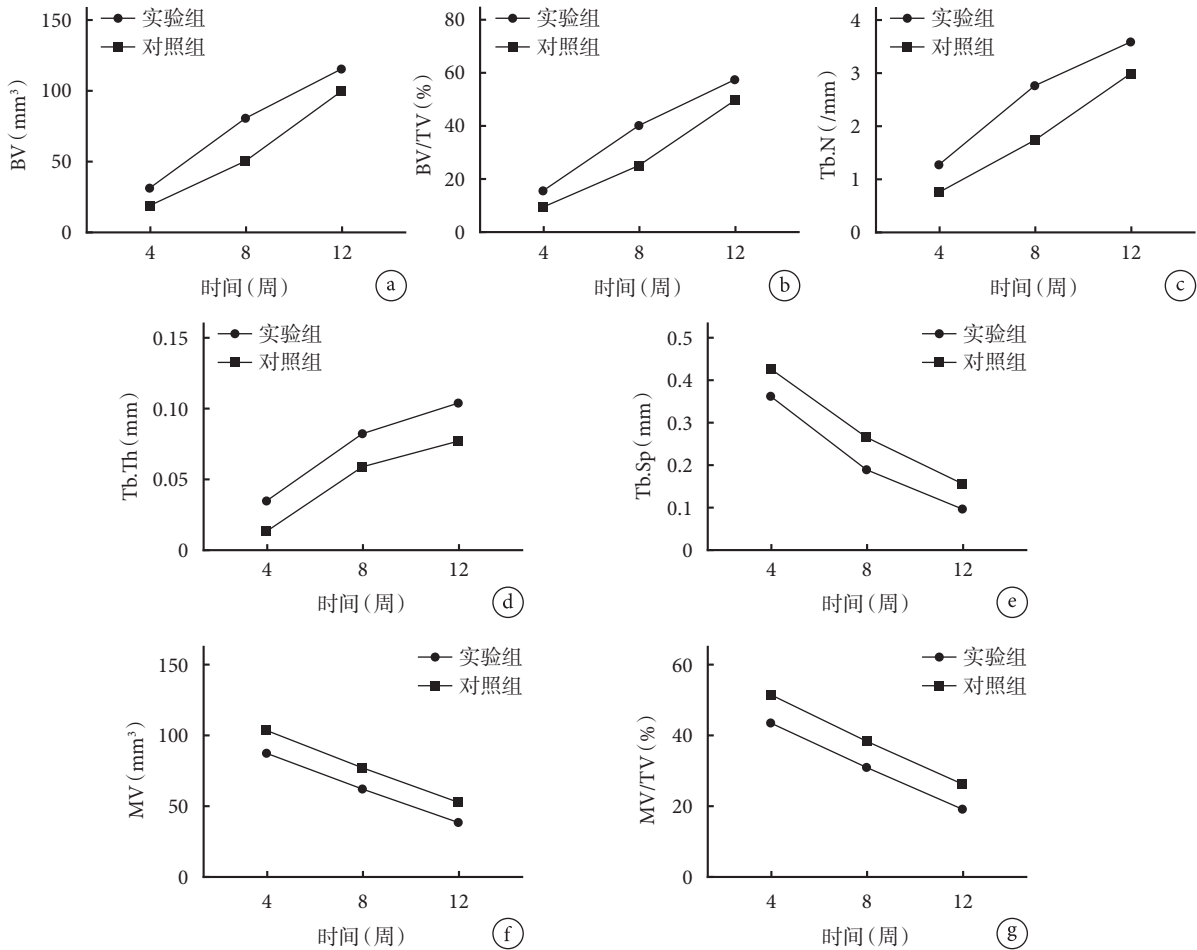


图8 术后各时间点两组 Micro-CT 定量检测 a. BV; b. BV/TV; c. Tb.N; d. Tb.Th; e. Tb.Sp; f. MV; g. MV/TV

Fig.8 Micro-CT quantitative detection at each time point after operation in the two groups a. BV; b. BV/TV; c. Tb.N; d. Tb.Th; e. Tb.Sp; f. MV; g. MV/TV

板结构未完全破坏,随着纤维蛋白不断溶解,血小板再度激活,能长期缓慢释放 PDGF、TGF-β 等各种生长因子,诱导成骨细胞迁移、增殖、分化,促进骨愈合^[18-21]。本研究通过在细胞培养基中添加不同浓度 CGFe,观察不同浓度 CGFe 对 MC 材料上

BMSCs 黏附、增殖和成骨分化的影响。相关研究表明^[22-25],浓度低于 10% 的 CGFe 以剂量依赖方式促进人骨髓基质细胞增殖和成熟,但浓度为 20% 时其对细胞的正向效果弱于 10%,而起到抑制作用,提示 CGFe 有一适宜的有效作用浓度。有学者^[116, 22]

分析存在这种双向效应的原因可能是 CGFe 不仅含有促进细胞增殖和诱导成骨的生长因子,同时还含有白细胞及 IL-1、TNF 等炎症因子。在高浓度 CGFe 下,抑制起主导作用,这些抑制作用可以体现在细胞增殖及成骨分化等多个方面。综上,CGF 富含多种功能的生长因子,在不同条件、不同浓度下可产生不同作用及效果。因此本实验通过设置 2%、5%、10% 3 种浓度,来探讨 CGFe 的最适浓度。

BMSCs 是由 Friedenstein 等^[26]于 20 世纪六七十年代通过骨髓培养法获得的贴壁生长细胞,并且他首次发现该细胞具有向成骨细胞、脂肪细胞等多种细胞系转化的潜能,还能够跨胚层分化。已有研究表明^[27],BMSCs 能向骨细胞系发展并形成矿化基质,进而形成骨组织。本研究通过体外实验将 hBMSCs 接种于 MC 材料上,采用经典成骨诱导机制,探究材料生物相容性和细胞成骨活性;同时,为更好修复骨缺损,增加材料临床应用性,在培养基内加入富含诱导成骨生长因子的 CGFe。体外实验中,hBMSCs 接种于 MC 材料表面后 24 h 扫描电镜观察,细胞在 MC 材料表面及孔隙中生长,有伪足黏附于材料;添加 CGFe 的 A、B、C 组细胞相对于不添加 CGFe 的 D 组伸出伪足较多,且深入到孔隙中,与材料相连。CCK-8 法检测示,A、B、C 组细胞增殖更早进入对数生长期,A 值显著高于 D 组,且 CGFe 浓度越高,细胞增殖能力越强。ALP 活性是干细胞向成骨细胞表型转化早期阶段的生物学标志物^[28],本研究检测结果显示,ALP 活性随成骨诱导时间延长而增高,A、B、C 组 ALP 活性明显高于 D 组,且 ALP 活性与 CGFe 浓度成正相关。OPN 表达被认为是成骨细胞分化成熟的晚期标志^[13,22]。本研究 Western blot 检测结果表明,A、B、C 组 OPN 蛋白相对表达量较 D 组升高,且 CGFe 浓度越高,OPN 蛋白条带灰度值越大。上述结果表明,MC 材料具有良好的生物相容性和细胞亲和性,CGF 在一定程度上能促进细胞黏附、伸展、增殖,在早期成骨细胞转化和晚期成骨矿化中也具有促进作用。同时,在一定浓度范围内,这种促进作用随浓度升高而增加,可认为在 10% 浓度以内 CGFe 促进作用与浓度成正相关,这与其他学者^[16,23]研究结果一致。

大量实验研究和临床实践证明^[29],MC 材料可模拟松质骨的微孔结构,为骨骼生长提供自然环境,并且具有良好生物相容性、骨传导性和骨诱导性。体内实验证实 CGF 单独应用或联合骨替代材料修复骨缺损,均表现出良好的骨再生潜能,能够

促进组织愈合和新生骨形成,在骨缺损修复等手术及术后抗感染、减轻炎症肿胀反应等方面具有良好效果^[30-31]。本研究将 CGF 与 MC 材料联合应用于兔下颌骨缺损修复,表现出良好的新骨形成和材料降解。术后 8 周 Micro-CT 结果显示实验组成骨效果优于对照组,实验组 BV、BV/TV、Tb.N 及 Tb.Th 显著高于对照组,MV、MV/TV、Tb.sp 均显著低于对照组。但对于 CGF 和 MC 材料联合使用增强成骨效果的机制尚不明确,有待进一步研究。本研究不足在于两种材料混合植入动物体内后,仅通过影像学检测评估了新骨形成情况,而植入后是否产生免疫排斥反应、组织学改变以及新骨形成后的生物力学等均需进一步探究。

综上所述,MC 材料具有良好的生物相容性,BMSCs 可以在 MC 材料上良好生长;CGF 可以促进 MC 材料上 BMSCs 的黏附、增殖和成骨分化,而且 10%CGFe 的促进作用明显强于 5%CGFe 和 2%CGFe,在 10% 浓度以内时 CGFe 促进作用与浓度成正相关。本研究为今后 CGF 和 MC 材料在骨缺损再生修复方面的联合应用奠定了基础。

作者贡献:张月直接参与实验研究,重点进行细胞实验、动物实验以及数据收集和文章撰写;刘克达参与动物实验及统计分析;闫明指导实验设计及实施;王蔚提供实验设计思路并把控实验的正确实施,文章修改,对文章的知识内容作批评性审阅。

利益冲突:所有作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。课题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。

机构伦理问题:研究方案经中国医科大学附属口腔医院医学伦理委员会批准[(2019)科伦审字(8)号]。志愿者均知情同意。动物使用许可证号:SYXK(辽)2013-0007。

参考文献

- 1 Sun XC, Wang H, Li JH, *et al*. Repair of alveolar cleft bone defects by bone collagen particles combined with human umbilical cord mesenchymal stem cells in rabbit. *Biomed Eng Online*, 2020, 19(1): 62.
- 2 Chivu M, Tantar C, Hutu E, *et al*. Evaluation of bone healing of artificial defects in laboratory animals after covering with alloplastic material. *Revista de Chimie*, 2018, 69(7): 1728-1732.
- 3 Zhao YQ, Tang RK. Improvement of organisms by biomimetic mineralization: A material incorporation strategy for biological modification. *Acta Biomater*, 2020. doi: 10.1016/j.actbio.2020.06.038.
- 4 Cui FZ, Li Y, Ge J. Self-assembly of mineralized collagen composites. *Materials Science and Engineering*, 2007, 57(1-6): 1-27.
- 5 Xu SJ, Qiu ZY, Wu JJ, *et al*. Osteogenic differentiation gene



- expression profiling of hMSCs on hydroxyapatite and mineralized collagen. *Tissue Eng Part A*, 2016, 22(1-2): 170-181.
- 6 姜力铭, 宋戈, 夏商, 等. 转化生长因子 $\beta 1$ 对人骨髓干细胞成骨分化作用研究. *中国实用口腔科杂志*, 2018, 11(9): 530-533.
 - 7 Qiao J, An N, Ouyang X. Quantification of growth factors in different platelet concentrates. *Platelets*, 2017, 28(8): 774-778.
 - 8 Qin J, Wang L, Sun Y, *et al.* Concentrated growth factor increases Schwann cell proliferation and neurotrophic factor secretion and promotes functional nerve recovery *in vivo*. *Int J Mol Med*, 2016, 37(2): 493-500.
 - 9 孙玉环, 何冬梅, 杨驰, 等. 自体浓缩生长因子膜对山羊髌突软骨缺损的修复作用. *中国口腔颌面外科杂志*, 2014, 12(3): 205-209.
 - 10 Chen X, Chen Y, Hou Y, *et al.* Modulation of proliferation and differentiation of gingiva-derived mesenchymal stem cells by concentrated growth factors: Potential implications in tissue engineering for dental regeneration and repair. *Int J Mol Med*, 2019, 44(1): 37-46.
 - 11 Fang D, Long Z, Hou J. Clinical Application of concentrated growth factor fibrin combined with bone repair materials in jaw defects. *J Oral Maxillofac Surg*, 2020, 78(6): 882-892.
 - 12 Çankaya ZT, Ünsal B, Gürbüz S, *et al.* Efficiency of concentrated growth factor in the surgical treatment of multiple adjacent papillary losses: A randomized, controlled, examiner-blinded clinical trial using CAD/CAM. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2020, 40(2): e73-e83.
 - 13 Honda H, Tamai N, Naka N, *et al.* Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in *Rattus norvegicus* calvaria defect model. *J Artif Organs*, 2013, 16(3): 305-315.
 - 14 陈琦, 李石岩, 禹鑫, 等. CGF 复合丝素蛋白-羟基磷灰石支架对兔下颌骨缺损的修复作用. *河北医学*, 2020, 26(4): 698-702.
 - 15 Qiu ZY, Cui Y, Tao CS, *et al.* Mineralized collagen: rationale, current status, and clinical applications. *Materials (Basel)*, 2015, 8(8): 4733-4750.
 - 16 Dohan Ehrenfest DM, Doglioli P, de Peppo GM, *et al.* Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates *in vitro* proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Arch Oral Biol*, 2010, 55(3): 185-194.
 - 17 Hong S, Chen W, Jiang B. A Comparative evaluation of concentrated growth factor and platelet-rich fibrin on the proliferation, migration, and differentiation of human stem cells of the apical papilla. *J Endod*, 2018, 44(6): 977-983.
 - 18 Sohn DS, Heo JU, Kwak DH, *et al.* Bone regeneration in the maxillary sinus using an autologous fibrin-rich block with concentrated growth factors alone. *Implant Dent*, 2011, 20(5): 389-395.
 - 19 Qiao J, An N. Effect of concentrated growth factors on function and Wnt3a expression of human periodontal ligament cells *in vitro*. *Platelets*, 2017, 28(3): 281-286.
 - 20 Yu X, Ren H, Shang Q, *et al.* Effect of bone marrow mesenchymal stem cell combined with concentrate growth factor (CGF) on postmenopausal bone defects. *Spine J*, 2019, 19(9): S166.
 - 21 Pirpir C, Yilmaz O, Candirli C, *et al.* Evaluation of effectiveness of concentrated growth factor on osseointegration. *Int J Implant Dent*, 2017, 3(1): 7.
 - 22 宦俊, 窦磊, 严崎方, 等. 浓缩生长因子促人脐静脉血管内皮细胞成血管化作用研究. *华西口腔医学杂志*, 2018, 36(3): 247-251.
 - 23 Chen X, Wang J, Yu L, *et al.* Concentrated growth factor promotes bone marrow-derived stromal cells osteogenesis: Optimal concentration and cell proliferation time. *J Biomater Tissue Eng*, 2017, 7(7): 595-604.
 - 24 Jun H, Lei D, Qi FY, *et al.* Effects of concentrated growth factors on the angiogenic properties of dental pulp cells and endothelial cells: An *in vitro* study. *Braz Oral Res*, 2018, 32: e48.
 - 25 Masuki H, Okudera T, Watanebe T, *et al.* Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *Int J Implant Dent*, 2016, 2(1): 19.
 - 26 Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 1976, 4(5): 267-274.
 - 27 Liu Y, Ming L, Luo H, *et al.* Integration of a calcined bovine bone and BMSC-sheet 3D scaffold and the promotion of bone regeneration in large defects. *Biomaterials*, 2013, 34(38): 9998-10006.
 - 28 Tang J, Yu H, Wang Y, *et al.* microRNA-199a counteracts glucocorticoid inhibition of bone marrow mesenchymal stem cell osteogenic differentiation through regulation of Klotho expression *in vitro*. *Cell Biol Int*, 2020, 44(12): 2532-2540.
 - 29 Pei B, Wang W, Dunne N, *et al.* Applications of carbon nanotubes in bone tissue regeneration and engineering: Superiority, concerns, current advancements, and prospects. *Nanomaterials*, 2019, 9(10): 1501.
 - 30 Li XJ, Yang HX, Zhang ZJ, *et al.* Platelet-rich fibrin exudate promotes the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells *in vitro*. *Mol Med Rep*, 2018, 18: 4477-4485.
 - 31 Li X, Yang H, Zhang Z, *et al.* Concentrated growth factor exudate enhances the proliferation of human periodontal ligament cells in the presence of TNF- α . *Molecular medicine reports*, 2019, 19(2): 943-950.

收稿日期: 2020-09-14 修回日期: 2021-01-02

本文编辑: 王雁