

富血小板血浆协同骨形态发生蛋白4促进骨愈合的效应

史剑杰, 罗志宾, 陈文雄 (广州医科大学附属第三医院口腔科, 广东省广州市 510150)

文章亮点:

1 研究表明骨形态发生蛋白在骨骼发育中的起到关键性作用, 但单独体内应用时成骨作用差; 富血小板血浆单独应用在动物或者临床试验中并不具备明显促进移植骨组织愈合的作用。
2 实验观察了富血小板血浆协同骨形态发生蛋白4 促骨缺损区的成骨作用, 结果表明以 β -磷酸三钙为支架, 富血小板血浆复合骨形态发生蛋白可明显促进骨缺损的愈合。

关键词:

组织构建; 骨组织工程; 骨形态发生蛋白; 富血小板血浆; 颌骨; β -磷酸三钙

主题词:

上颌骨; 骨形态发生蛋白质类; 富血小板血浆; 磷酸钙类

基金资助:

广东省科技发展项目(2010B060900087); 课题名称: PRP 协同 BMP-4 修复下颌骨缺损的动物实验研究

摘要

背景: 研究表明骨形态发生蛋白在骨骼发育中的起到关键性作用; 文献报道单独的富血小板血浆在动物或者临床试验中并不具备明显促进移植骨组织愈合的作用。

目的: 验证富血小板血浆协同骨形态发生蛋白4 促骨缺损区的成骨作用。

方法: 24 只新西兰大白兔构建上颌骨骨缺损模型, 随机分为4组, 每组6只。①空白对照组建模后不做特殊处理。② β -磷酸三钙+Bio-gide 生物膜组为 β -磷酸三钙 0.1 g+Bio-gide 生物膜 1 张。③富血小板血浆组为 β -磷酸三钙 0.1 g+Bio-gide 生物膜 1 张+富血小板血浆 1 mL。④富血小板血浆+骨形态发生蛋白4 组为 β -磷酸三钙 0.1 g+Bio-gide 生物膜 1 张+富血小板血浆 1 mL+5 μ g 骨形态发生蛋白4。于造模后4, 8, 12 周行大体观察、组织学观察及图像分析各组骨缺损区新生骨生成情况。

结果与结论: 术后4周, 富血小板血浆组、富血小板血浆+骨形态发生蛋白4 组骨缺损区新生骨以及新生血管均多于 β -磷酸三钙+Bio-gide 组($P < 0.01$); β -磷酸三钙+Bio-gide 组新成骨多于空白对照组($P < 0.01$)。术后4, 8, 12 周, 富血小板血浆+骨形态发生蛋白4 组骨缺损区新生骨均多于 β -磷酸三钙+Bio-gide 组、富血小板血浆组两组骨缺损区($P < 0.01$), β -磷酸三钙+Bio-gide 组和富血小板血浆组均多于空白对照组($P < 0.01$)。结果表明以 β -磷酸三钙为支架, 富血小板血浆复合骨形态发生蛋白可明显促进骨缺损的愈合。

史剑杰, 罗志宾, 陈文雄. 富血小板血浆协同骨形态发生蛋白4 促进骨愈合的效应[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(38):6099-6104.

Bone morphogenetic protein-4 compounded with platelet-rich plasma promotes bone healing

Shi Jian-jie, Luo Zhi-bin, Chen Wen-xiong (Department of Stomatology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that bone morphogenetic proteins play a key role in skeletal development. Platelet-rich plasma alone in animal or clinical trials cannot significantly promote bone graft healing.

OBJECTIVE: To investigate the osteogenesis effect of bone morphogenetic protein-4 compounded with platelet-rich plasma the bone defect area.

METHODS: Twenty-four New Zealand white rabbits were selected to establish maxillary bone defect models, and then were randomly divided into four groups, six rats in each group. Group A was blank control group; Group B was β -tricalcium phosphate (0.1 g)+Bio-gide group; group C was β -tricalcium phosphate (0.1 g)+Bio-gide+platelet-rich plasma (1 mL) group; and group D was β -tricalcium phosphate (0.1 g)+Bio-gide+platelet-rich plasma (1 mL)+bone morphogenetic protein-4 (5 μ g). Gross observation, histological observation and imaging analysis were performed for analysis of new bone formation at weeks 4, 8, 12 after modeling.

RESULTS AND CONCLUSION: After 4 weeks, group D had more new bone and vessels formed in the bone defect area than the group B ($P < 0.01$); however, the amount of new bone was higher in the group B than the group A ($P < 0.01$). After 4, 8, 12 weeks, the amount of new bone in the bone defect area was higher in the group D than the groups B and C ($P < 0.01$), and lowest in the group A ($P < 0.01$). In the β -tricalcium phosphate scaffold, platelet-rich plasma combined with bone morphogenetic protein can significantly promote the healing of bone defects.

史剑杰, 男, 1965 年生, 湖南省益阳市人, 汉族, 1989 年中山医科大学毕业, 主任医师, 主要从事口腔颌面外科研究。

通讯作者: 罗志宾, 硕士, 主治医师, 广州医科大学附属第三医院口腔科, 广东省广州市 510150

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.38.006
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2014)38-06099-06
稿件接受: 2014-08-21

Shi Jian-jie, Chief physician, Department of Stomatology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China

Corresponding author: Luo Zhi-bin, Master, Attending physician, Department of Stomatology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-08-21

Subject headings: maxilla; bone morphogenetic proteins; platelet-rich plasma; calcium phosphates

Funding: the Science and Technology Development Program of Guangdong Province, No. 2010B060900087

Shi JJ, Luo ZB, Chen WX. Bone morphogenetic protein-4 compounded with platelet-rich plasma promotes bone healing. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(38):6099-6104.

0 引言 Introduction

骨骼是一个动态的多功能器官,具有一定的自我修复能力。然而,当骨组织缺损过多时,骨组织修复功能受限,其固有的再生潜能已无法自行修复缺损的骨组织,必需介入外科治疗,组织工程学能很好的解决骨再生问题。组织工程的关键因素包括骨传导支架、生长因子、血管形成细胞与成骨细胞的移植和供应潜力。

合适的生物材料用于骨组织的再生重建,已经成为骨组织工程一个重要的研究课题。目前,大多数生物材料缺乏很好的生物活性,骨移植材料植入缺损区后,本身只起到被动的支架作用,等待新生骨爬行替代,显著延长了新骨构建时间,因此,必须结合使用骨诱导类生物材料。最常使用的骨诱导性材料是局部递送的生长因子,诸如骨形态发生蛋白家族、血管内皮生长因子和转化生长因子等。

1986年Carlsson等^[1]报道人工牙种植要求的解剖条件为牙槽突高度应大于10 mm,宽度应大于5 mm。牙齿长时间缺失,将导致牙槽突吸收,临床上40%-60%的病例均存在因牙槽突吸收而导致骨量不足的问题^[2]。

1971年Balk等^[3]学者报道血小板内富含生长因子,如血小板衍生生长因子、转化生长因子、 β -血管内皮生长因子、胰岛素样生长因子1、表皮生长因子和结缔组织激活多肽-III(CTAP-III)。富血小板血浆是一种浓缩的自体血小板,可以用作自体纤维蛋白胶系统。目前临床使用富血小板血浆主要应用于包括神经损伤、肌腱炎、心肌损伤、骨创伤等的修复治疗和口腔科颌骨重建等方面^[4-5],但单独的富血小板血浆在动物或者临床试验中并不具备明显促进移植骨组织愈合的作用^[6-7]。

1971年,Urist^[8]通过实验发现某类骨诱导物质可以为反应细胞所感知,通过激活或抑制细胞内的基因,调节诱导骨系细胞的分化和增生,从而产生新骨,这类诱导新骨形成的物质即为骨形态发生蛋白。大量的体外和体内研究表明这些蛋白质在骨痂形成过程中起到积极的激动或拮抗作用,潜在诱导成骨细胞分化作用^[9],已被FDA批准使用在人类脊柱融合术,口腔颌面部的应用和治疗某些骨折^[10]。

实验通过观察富血小板血浆协同骨形态发生蛋白4联合 β -磷酸三钙在大白兔上颌骨缺损中的诱导成骨作用,证明以 β -磷酸三钙为支架的富血小板血浆协同骨形态发生蛋白4具有加速成骨作用,缩短临床骨愈合时间。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2012年1月至2013年10月在中山

大学动物实验中心完成。

材料:

实验动物: 雄性新西兰大白兔24只,体质量2.0-2.8 kg,平均(2.54±0.85) kg,由南方医科大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK:粤2006-0015。

富血小板血浆协同骨形态发生蛋白4促骨愈合动物实验所用材料:

| 实验材料 | 来源 |
|---------------|----------------------------------|
| β -磷酸三钙 | 上海贝贝路公司 |
| Bio-gide 生物膜 | Geistlich Pharma AG, Switzerland |
| 骨形态发生蛋白4 | Stryker®, USA |

实验方法:

实验分组: 取新西兰大白兔24只,随机分为4组,每组6只。

| 组别 | 材料配制方法 |
|-----------------------------|---|
| 空白对照组 | 无 |
| β -磷酸三钙+Bio-gide 生物膜组 | β -磷酸三钙 0.1 g+Bio-gide 生物膜 1 张 |
| 富血小板血浆组 | β -磷酸三钙 0.1 g+Bio-gide 生物膜 1 张+富血小板血浆 1 mL |
| 富血小板血浆+骨形态发生蛋白4组 | β -磷酸三钙 0.1 g+Bio-gide 生物膜 1 张+富血小板血浆 1 mL+5 μ g 骨形态发生蛋白4 |

新西兰大白兔骨缺损模型建立: 术前12 h禁食,每只兔术前速眠新肌肉注射麻醉。动物麻醉后,置于手术台上,取侧卧位,备皮,安尔碘消毒口腔及口周,铺消毒巾。在大白兔上颌中切牙远中无牙区行梯形切口,进行牙龈翻瓣术,暴露牙槽嵴,在其颊侧制备10 mm×10 mm×5 mm箱状骨缺损模型,制备过程用生理盐水降温,一共获得左右各一的2个颌骨缺损区。

改良法Curasan法制备富血小板血浆制备: 术前麻醉下抽取大白兔静脉血,与枸橼酸钠抗凝剂(全血与抗凝剂比例约为1:9)充分混匀后进行第1次离心(2 400 r/min, 10 min),吸取血浆与细胞交界处上层3 mm层厚血浆(包含血小板和白细胞层)及下方2 mm厚内血浆及细胞,进行第2次离心(3 600 r/min, 15 min),底层为浓缩血小板、少量红细胞和白细胞的混合物,充分悬浮后即成富血小板血浆,收集、摇匀、备用。

引导骨组织再生术: 术中将10%氯化钙的生理盐水及同体积的100 U/mL牛凝血酶滴入制备好的富血小板血浆加以活化,形成富血小板血浆凝胶备用。按照实验分组配制上述各组材料,随机植入颌骨缺损区,做好记录,严密缝合创口,术后流质饮食增加营养,避免机械摩擦伤口,

预防性青霉素抗炎治疗(图1)。

建模后处理: 引导骨组织再生术后4, 8和12周分别随机空气栓塞处死动物。动物处死后, 仰卧解剖分离上颌骨, 去除周围软组织, 用线锯截取含双侧实验部分的上颌骨标本, 立即浸泡于体积分数4%甲醛丹尔溶液中固定待用。

主要观察指标: ①大体观察术区创口愈合情况, 新生骨情况。②光学显微镜下观察新骨形成情况。③应用计算机组织学图像分析缺损区新生骨生成结果。

统计学分析: 采用SPSS 16.0统计软件进行单因素方差分析, 同一时间点各组间的差异用LSD法比较。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大白兔24只, 分为4组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 兔骨缺损区大体观察 大体标本可见12周时空白对照组成骨较差, 缺损区中间凹陷, 表面纤维组织增生; 余各组成骨作用好, 成骨饱满, 表面光滑(图2)。

2.3 兔骨缺损区组织学观察

4周: 富血小板血浆组、富血小板血浆+骨形态发生蛋白4组两组骨缺损处见新生血管丰富, 其中富血小板血浆+骨形态发生蛋白4组可见较多的纤维性骨痂形成, 局部见较多成骨细胞及软骨细胞增生活跃, 骨移植颗粒开始降解, 可见与骨干平行的骨样组织, 富血小板血浆组见纤维组织生长, 材料降解为网状, 周围有炎性细胞和少量骨母细胞(见图3)。空白对照组、 β -磷酸三钙+Bio-gide生物膜组两组骨缺损区见少量新生血管, β -磷酸三钙+Bio-gide生物膜组周可见大量散在骨粉颗粒及纤维组织结构, 其间散在数量不等的成骨细胞和软骨细胞, 成骨作用较对照组强。

8周: 富血小板血浆+骨形态发生蛋白4组缺损区内骨粉颗粒明显较 β -磷酸三钙+Bio-gide生物膜组、富血小板血浆组减少, 伴随着大量骨样组织形成, 钙化、沉积明显; β -磷酸三钙+Bio-gide生物膜组、富血小板血浆组局部见新生骨组织, 少量破骨细胞, 少量钙盐沉积, 两组间差异无显著性意义; 空白对照组出现以纤维性骨痂为主, 自体骨边缘见少量新生骨组织, 明显较 β -磷酸三钙+Bio-gide生物膜组、富血小板血浆组少(图4)。

12周: 富血小板血浆+骨形态发生蛋白4组主要为成熟骨, 为板层骨, 可见哈佛氏小管形成, 散在少量编织骨, 骨粉颗粒明显减少, 少量破骨细胞(图5)。

2.4 组织学图像分析缺损区新生骨结果 计算机图像分析显示, 伴随愈合时间推移, 新骨形成逐渐增多, β -磷酸三钙颗粒逐渐降解, 其中富血小板血浆+骨形态发生蛋白4组12周时新生骨略高于8周但两者差异无显著性意义($P > 0.05$)。

术后4周, 富血小板血浆+骨形态发生蛋白4组新生骨略多于富血小板血浆组, 但两组间差异无显著性意义($P > 0.05$), 富血小板血浆组、富血小板血浆+骨形态发生

蛋白4组两组骨缺损区新生骨以及新生血管均多于 β -磷酸三钙+Bio-gide组实验侧($P < 0.01$), β -磷酸三钙+Bio-gide组新成骨多于空白对照组($P < 0.01$); 术后4, 8, 12周, 富血小板血浆+骨形态发生蛋白4组骨缺损区新生骨均多于 β -磷酸三钙+Bio-gide组、富血小板血浆组两组骨缺损区($P < 0.01$), 富血小板血浆组略多于 β -磷酸三钙+Bio-gide组, 但两者差异无显著性意义($P > 0.05$), β -磷酸三钙+Bio-gide组、富血小板血浆组两组均多于空白对照组($P < 0.01$)。

3 讨论 Discussion

骨组织是支持和保护脊椎动物的主要系统, 在口腔中, 更是维持面部外观, 行使咀嚼功能的重要构成部分, 充足的骨量, 是口腔种植体植入的首要条件。成年后骨组织发育缓慢, 甚至出现停滞、倒退。在骨缺损区域, 炎症和粒状组织形成过程中, 软骨膜产生的各种重要自分泌和旁分泌生长因子, 如骨形态发生蛋白2, 4和7, 胰岛素样生长因子1, 2、转化生长因子 β 、血小板源性生长因子、 γ 干扰素等, 诱导间充质干细胞分化为成骨细胞, 从而刺激血管生成, 促使骨组织结构构建完成^[11]。本实验采用骨形态发生蛋白4复合富血小板血浆修复骨缺损动物模型, 通过人工加入骨愈合过程中所需多种生长因子, 缩短骨组织愈合的生理病理反应过程, 加速骨缺损愈合。

1971年, Urist^[8]通过实验发现某类骨诱导物质可以为反映细胞所感知, 通过激活或抑制细胞内的基因, 调节骨系细胞的分化和增生, 并将其定义为骨形态发生蛋白。Wallace等^[12]实验表明, 低浓度骨形态发生蛋白能够诱导间充质细胞向骨组织形成区移行; 中等浓度骨形态发生蛋白可以促进间充质细胞向成软骨及成骨细胞方向分化; 而高浓度骨形态发生蛋白 则能促进间充质细胞的增生。

大量的研究已表明骨形态发生蛋白在骨骼发育中的起到关键性作用^[13-15]。脊椎动物的骨骼组成骨和软骨, 包含3种主要的细胞类型: 软骨细胞、成骨细胞和破骨细胞^[16]。骨生成主要有膜骨化(成骨细胞分化)和软骨内成骨化(软骨细胞分化), 由骨形成蛋白2和骨形态蛋白4分化诱导成骨细胞和软骨细胞, 形成骨和软骨^[17]。Wang等^[18]研究认为, 骨形态发生蛋白主要对未分化间充质细胞和骨系细胞起到募集和分化作用。在骨形成早期, 骨形态发生蛋白不仅可使未分化间充质细胞向骨形成中心募集, 并分化为骨系细胞, 而且可使成纤维细胞、成肌细胞及骨髓的基细胞逆分化分化为骨系细胞。研究表明骨形态发生蛋白是惟一可单独异位成骨的细胞因子, 然而由于骨形态发生蛋白植入受体后会快速溶解到水中从而降低了其诱导成骨作用^[19]。因此, 良好的骨形态发生蛋白载体必须能较好的运载、保存和释放, 使其在植入位点能达到骨诱导的作用, 提供稳定的空间以便骨形成能够发生; 形成的这个空间必须能够维持足够长的时间保证新骨形成后有足够的时间成熟^[20-22]。

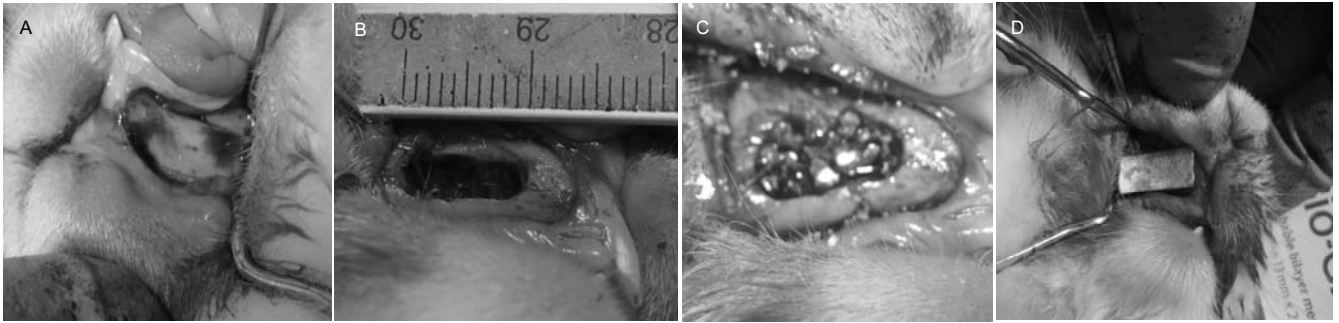


图 1 兔上颌骨缺损引导骨组织再生实验步骤

Figure 1 Experimental procedures of rabbit mandibular defect-guided bone regeneration

图注: 图中 A 为选取新西兰大白兔上颌骨作为实验位点; B 为制作 10 mm×5.0 mm 骨缺损模型; C, D 为植入骨粉、骨膜。

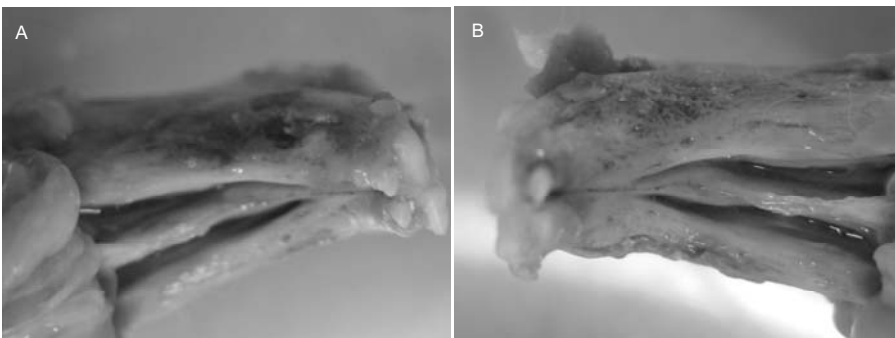


图 2 兔上颌骨缺损引导骨组织再生术后 12 周大体标本

Figure 2 Gross observation of rabbit mandibular defect-guided bone regeneration at 12 weeks

图注: 图中 A 为空白对照组成骨较差, 缺损区中间凹陷, 表面纤维组织增生; B 为其余各组成骨作用好, 成骨饱满, 表面光滑。

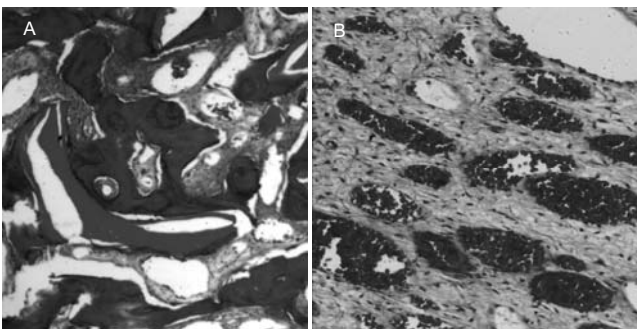


图 3 兔上颌骨缺损引导骨组织再生术后 4 周时骨组织切片(×4)

Figure 3 Histological observation at 4 weeks after rabbit mandibular defect-guided bone regeneration (×4)

图注: 图中 A 为富血小板血浆+骨形态发生蛋白 4 组可见较多的纤维性骨痂形成, 骨移植颗粒开始降解; B 为富血小板血浆组、富血小板血浆+骨形态发生蛋白 4 组两组内血管增生明显。

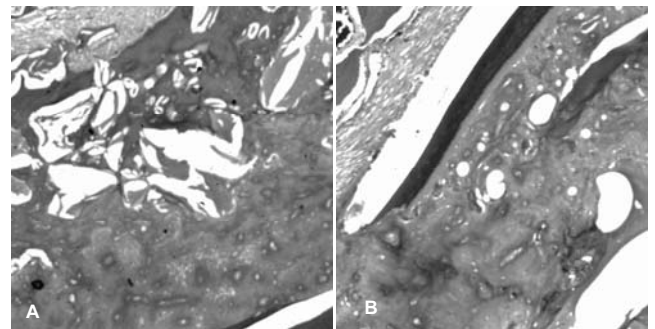


图 5 兔上颌骨缺损引导骨组织再生术后 12 周时骨组织切片(×4)

Figure 5 Histological observation at 12 weeks after rabbit mandibular defect-guided bone regeneration (×4)

图注: 富血小板血浆+骨形态发生蛋白 4 组主要为成熟骨, 板层骨, 可见哈佛氏小管形成, 散在少量编织骨, 少量破骨细胞, 骨粉颗粒明显减少。

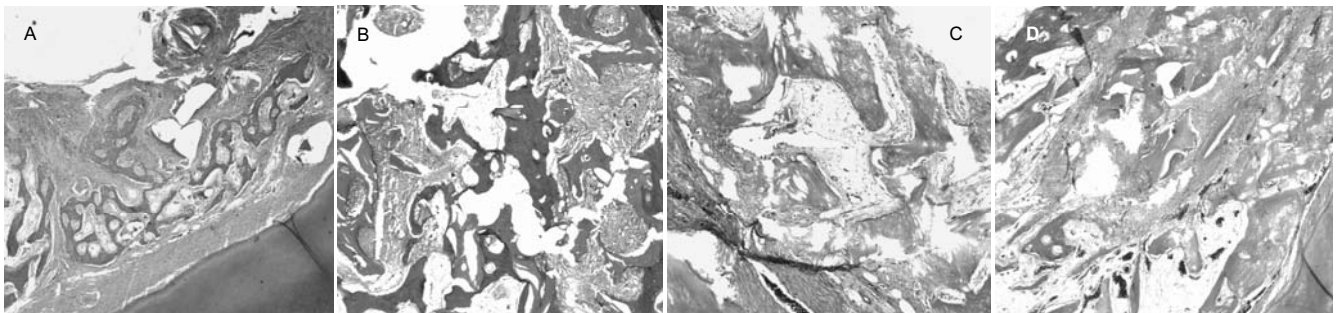


图 4 兔上颌骨缺损引导骨组织再生术后 8 周时骨组织切片(×4)

Figure 4 Histological observation at 8 weeks after rabbit mandibular defect-guided bone regeneration (×4)

图注: 图 A 为空白对照组出现以纤维性骨痂为主, 自体骨边缘见少量新生骨组织; B 为 β -磷酸三钙+Bio-gide 生物膜组出现新生骨, 以纤维性骨痂及骨粉颗粒为主; C 为富血小板血浆组局部见新生骨组织, 骨粉颗粒出现降解, 少量钙盐沉积; D 为富血小板血浆+骨形态发生蛋白 4 组缺损区内骨粉颗粒降解明显, 大量骨样组织形成, 钙化、沉积明显。

早期的研究中所使用脱钙骨基质和胶原海绵作为支架包埋骨形态蛋白, 因为它们构成了原始骨成分^[23-24]。胶原蛋白具有广泛的可用性, 全生物可降解性, 生物相容性等优点, 然而由于其异种来源具有病原传播的潜在风险, 而且在体内迅速降解, 无法满足“时空要求”。

合成聚合物, 如聚乳酸、聚乙醇酸及水凝胶等具有良好的物理化学性质并且避免病原污染的潜在风险, 然而, 机体炎症反应可促使其快速降解也表明了合成聚合物也不是作为支架的良好选择^[25]。

β -磷酸三钙主要是由钙、磷组成, 其成分与骨基质的无机成分相似, 与骨结合好。动物或人体细胞可以在 β -磷酸三钙材料上正常生长, 分化和繁殖, 具有非凡的骨传导能力, 被广泛地在骨修复^[26-27]。骨形态发生蛋白协同成骨样的钙磷酸盐有助于控制骨形态发生蛋白的释放并且增复合物的机械强度^[28]。本研究采用 β -磷酸三钙作为支架, 复合富血小板血浆提供必要的骨愈合生长因子, 同时富血小板血浆作为一种浓缩源的自体血小板, 可以用作自体纤维蛋白胶系统, 能更好的结合骨形态发生蛋白4均匀分布于 β -磷酸三钙空隙内, 有利于缓慢释放骨形态发生蛋白4, 维持术区骨形态发生蛋白4浓度^[29]。

罗英伟等^[30]实验证明Meckel's软骨细胞中表达的骨形态发生蛋白4 mRNA具有诱导未分化间充质细胞凝聚的作用。同时诱导未分化间充质细胞向成骨细胞分化, 分泌骨基质, 形成下颌骨。而且随着下颌骨的生长发育, 细胞分泌骨基质的增加, 成骨功能的活跃。实验证明骨形态发生蛋白4作为形态发生过程中的信号因子, 能促进Msx1突小鼠牙胚的间充质组织的细胞分裂, 其作用之一是能促进维持有关组织的细胞分裂^[31]。

富血小板血浆是自体全血经离心后得到的血小板浓缩物, 天然含有大量生长因子, 对促骨组织愈合具有积极作用。血小板脱颗粒释放的转化生长因子 β 是以旁分泌的形式来影响成纤维细胞、骨髓干细胞和前骨母细胞增殖和分化, 转化生长因子 β 在骨愈合过程中起到维持或增强成骨细胞活性的作用^[32]。它同时也是聚集在骨损伤部位血小板所释放的最重要生长因子之一。血管内皮生长因子是一种促进内皮细胞增生和血管生成的调节剂, 可能参与伤口愈合中对血管生成的调节^[33]。血小板衍生生长因子对多种类型的细胞都有作用, 它对中胚层来源的细胞具有促进其有丝分裂的作用^[34]。胰岛素样生长因子1可刺激培养中的成骨细胞增殖、分化并合成骨基质蛋白^[35]。胰岛素样生长因子1能刺激碱性磷酸酶、骨桥蛋白、骨髓基质细胞中降钙素mRNA的表达^[36]。每种生长因子都不是独立的产生作用, 多种生长因子作用于同一代谢过程时, 会相互产生影响, 可以是相互拮抗, 也可以是相互协同作用。Meraw等^[37]将转化生长因子 β 与碳酸钙联合用于骨重建实验, 骨再生作用并不明显, 但将它们与其他生长因子如骨形态发生蛋白、血小板衍生生长因子、胰岛素样生长因子等联合, 其骨再生效果

明显加强。

Sipe等^[38]指出血小板以及巨核细胞可协同骨形态发生蛋白2, 4和6产生强大的骨诱导作用; 富血小板血浆还可形成水凝胶, 有利于细胞移植、黏附以及增生。新血管的形成对于骨组织愈合具有重要的作用, 骨愈合的第一步必将是血管的重建, 伤口早期完整有效的血管网络形成不仅是骨形成的先决条件, 而且对于后期骨组织质量也具有重要的影响^[39]。微环境改变造成血供不足或者组织缺氧都可以抑制成骨细胞分化^[40]。据此, 富血小板血浆对骨愈合的主要作用在于促进血管形成, 为骨愈合提高良好的微环境, 从而促进成骨作用。

实验结果显示, 经术后4, 8, 12周大体观察和组织学观察兔上颌骨缺损区, 富血小板血浆组、富血小板血浆+骨形态发生蛋白4组骨缺损区新生骨以及新生血管均多于 β -磷酸三钙+Bio-gide组。术后6, 8, 12周, 富血小板血浆+骨形态发生蛋白4组骨缺损区新生骨均多于 β -磷酸三钙+Bio-gide组、富血小板血浆组。结果表明以 β -磷酸三钙为支架, 富血小板血浆复合骨形态发生蛋白可明显促进骨缺损的愈合, 具有较高的临床应用价值。

作者贡献: 设计为通讯作者; 实施为通讯作者和第一作者, 评估者为第三作者, 盲法评估。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 骨形态发生蛋白-是一种能够通过诱导成骨修复骨缺损的生物材料, 是一类生长分化因子家族, 作用具有浓度依赖性, 与相应感受器结合会产生一系列骨形态发生蛋白反应基因的信号表达和转录, 诱导间质细胞分化为骨或软骨。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Carlsson L, Röstlund T, Albrektsson B, et al. Osseointegration of titanium implants. Acta Orthop Scand. 1986;57(4):285-289.
- [2] Joos U, Kleinheinz J. Reconstruction of the severely resorbed (Class VI) jaws: routine or exception? J Craniomaxillofac Surg. 2000;28(1): 1-4.
- [3] Balk SD. Calcium as a regulator of the proliferation of normal, but not of transformed, chicken fibroblasts in a plasma-containing medium. Proc Natl Acad Sci USA. 1971;68(2): 271-276.
- [4] Hildner F, Albrecht C, Gabriel C, et al. State of the art and future perspectives of articular cartilage regeneration: a focus on adipose-derived stem cells and platelet-derived products. J Tissue Eng Regen Med. 2011;5(4):e36-51.
- [5] Lee KS, Wilson JJ, Rabago DP, et al. Musculoskeletal applications of platelet-rich plasma: fad or future? AJR Am J Roentgenol. 2011; 196:628-636
- [6] Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem RS, et al. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? Clin Oral Implants Res. 2005;16(3): 349-356.

- [7] Por YC, Barceló CR, Salyer KE, et al. Bone generation in the reconstruction of a critical size calvarial defect in an experimental model. *J Craniofac Surg.* 2008;19(2): 383-392.
- [8] Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res.* 1971;50(6): 1392-1406.
- [9] Reichert JC, Woodruff MA, Friis T, et al. Ovine bone- and marrow-derived progenitor cells and their potential for scaffold-based bone tissue engineering applications in vitro and in vivo. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010;4:565-576.
- [10] De Biase P, Capanna R. Clinical applications of MBP. *Injury.* 2005;36(Suppl 3):S43-S46.
- [11] Deschaseaux F, Sensebe L, Heymann D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med.* 2009;15: 417-429.
- [12] Wallace AL, Makki R, Weiss JB, et al. Measurement of serum angiogenic factor in devascularized experimental tibial fractures. *J Orthop Trauma.* 1995;9(4): 324-332.
- [13] Carreira AC1, Lojudice FH, Halcsik E, et al. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res.* 2014;93(4):335-380.
- [14] Ali IH, Brazil DP. Bone morphogenetic proteins and their antagonists: current and emerging clinical uses. *Br J Pharmacol.* 2014;171(15):3620-3652.
- [15] Boerckel JD, Kolambkar YM, Dupont KM, et al. Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. *Biomaterials.* 2011;32: 5241-5251.
- [16] Karsenty G. The complexities of skeletal biology. *Nature.* 2003; 423: 316-318.
- [17] Nakamura J, Yanagita M. Bmp modulators in kidney disease. *Discov Med.* 2012; 13: 57-63.
- [18] Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(6): 2220-2224.
- [19] Nakahara H, Takaoka K, Koezuka M, et al. Periosteal bone formation elicited by partially purified bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res.* 1989;(239): 299-305.
- [20] Kim CS, Kim JI, Kim J, et al. Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic proteins-2 using absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carriers. *Biomaterials.* 2005;26(15): 2501-2507.
- [21] Degat MC, Ferreira E, Logeart-Avramoglou D. Use of growth factors in the repair of bone. *Pathol Biol (Paris).* 2005;53: 131-141.
- [22] Ben-David D, Srouji S, Shapira-Schweitzer K, et al. Low dose BMP-2 treatment for bone repair using a PEGylated fibrinogen hydrogel matrix. *Biomaterials.* 2013;34:2902-2910.
- [23] Winn SR, Uludag H, Hollinger JO. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res.* 1999; 367 (Suppl):95-106.
- [24] Yang X, Han G, Pang X, et al. Chitosan/collagen scaffold containing bone morphogenetic protein-7 DNA supports dental pulp stem cell differentiation in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2012; Feb 18. doi: 10.1002/jbm.a.34064. [Epub ahead of print]
- [25] Polimeni G, Koo KT, Pringle GA, et al. Histopathological observations of a polylactic acid-based device intended for guided bone/tissue regeneration. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2008;10:99-105.
- [26] Cestari TM, Granjeiro JM, de Assis GF, et al. Bone repair and augmentation using block of sintered bovine-derived anorganic bone graft in cranial bone defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20:340-350.
- [27] Salgado PC, Sathler PC, Castro HC, et al. Bone remodeling, biomaterials and technological applications: revisiting basic concepts. *J Biomater Nanobiotechnol.* 2011;2:318-328.
- [28] Hagi TT, Wu G, Liu Y, et al. Cell-mediated BMP-2 liberation promotes bone formation in a mechanically unstable implant environment. *Bone.* 2010;46:1322-1327.
- [29] Berner A, Boerckel JD, Saifzadeh S, et al. Biomimetic tubular nanofiber mesh and platelet rich plasma-mediated delivery of bmp-7 for large bone defect regeneration. *Cell Tissue Res.* 2012;347(3):603-615.
- [30] 罗应伟, 李松, 沈丽宁. BMP-4 mRNA在Meckel's软骨中的表达及意义. [J]. *昆明医学院学报.* 2004;25(3):9-12.
- [31] Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* 2005;36(12): 1392-1404.
- [32] Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev.* 1999;13(9):1055-1066.
- [33] Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clin Proc.* 2006;81(9):1241-1257.
- [34] Conover CA. In vitro studies of insulin-like growth factor I and bone. *Growth Horm IGF Res.* 2000; 10 Suppl B:S107-10. Review.
- [35] Canalis E. Effect of insulinlike growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest.* 1980; 66(4):709-719.
- [36] Tanaka H, Quarto R, Williams S, et al. In vivo and in vitro effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on femoral mRNA expression in old rats. *Bone.* 1994; 15(6):647-53.
- [37] Meraw SJ, Reeve CM, Lohse CM, et al. Treatment of peri-implant defects with combination growth factor cement. *J Periodontol.* 2000;71(1):8-13.
- [38] Sipe JB, Zhang J, Waits C, et al. Localization of bone morphogenetic proteins (MBP)-2, -4, and -6 within megakaryocytes and platelets. *Bone.* 2004;35(6):1316-1322.
- [39] Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;(355 Suppl): S82-89. 23.
- [40] Salim A, Nacamuli RP, Morgan EF, et al. Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx2 expression in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2004;279(38): 40007-40016.