浓缩生长因子负载脂肪干细胞预防 SD 大鼠双膦酸盐类药物相关性颌骨骨坏死

https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3529

投稿日期：2020-05-28

送审日期：2020-05-29

采用日期：2020-07-06

在线日期：2020-11-06

中图分类号：

R459.9；R318.08；R782.1

文章编号：

2095-4344(2021)19-02982-06

文献标识码：A

张圣敏[1]，曹长红[1]，刘 超[2]

文章快速阅读：

文章特点—

△拔牙引起的颌骨和牙周组织损伤是诱发双膦酸盐类药物相关性颌骨骨坏死发生的重要因素，临床尚无标准化治疗方案，现阶段多主张以预防为主；

△通过应用浓缩生长因子负载脂肪干细胞发现其对双膦酸盐类药物相关性颌骨骨坏死有显著预防作用。

SD 大鼠随机分为 4 组

对照组：	唑来膦酸组：	浓缩生长因子组：	浓缩生长因子 / 脂肪干细胞组：
尾静脉注射生理盐水 12 周，第 8 周拔牙后不处理。	尾静脉注射唑来膦酸 12 周，第 8 周拔牙后不处理。	尾静脉注射唑来膦酸 12 周，第 8 周拔牙后立即植入浓缩生长因子。	尾静脉注射唑来膦酸 12 周，第 8 周拔牙后立即植入浓缩生长因子 / 脂肪干细胞复合体。

主要观察指标：
拔牙后 8 周，分别通过拔牙创观察、Micro-CT、苏木精－伊红染色评估牙龈再生、拔牙创周围骨组织再生情况。

文题释义：

双膦酸盐类药物相关性颌骨骨坏死：其特征是保持在8周以上且未表现出好转的骨坏死，目前或曾经有过双膦酸盐治疗史，但没有头颈部放疗史。

唑来膦酸：是一种具有较强抑制骨吸收和潜在促进骨形成作用的双膦酸盐类药物。临床主要用于恶性肿瘤引起的骨转移、骨质疏松症、高钙血症等治疗。

浓缩生长因子：是一种结构疏松、弹性好、可塑性强、富含多种生长因子的三维网络聚合物，为干细胞增殖和分化提供了可靠的微环境。

摘要

背景：双膦酸盐类药物相关性颌骨骨坏死的病因可能涉及侵袭性牙科手术、感染、颌骨机械性损伤、免疫抑制剂和化疗药物等，但其潜在机制和治疗尚不清楚，预防是主要的临床命题。

目的：探讨浓缩生长因子负载脂肪干细胞对双膦酸盐类药物相关性颌骨骨坏死的全面预防作用。

方法：40只SD大鼠随机分为4组：对照组、唑来膦酸组、浓缩生长因子组、脂肪干细胞联合浓缩生长因子组，每组10只。除对照组外，其他3组尾静脉注射唑来膦酸(80 μg/kg)，每周1次，连续给药12周建立双膦酸盐类药物相关性颌骨骨坏死模型；对照组尾静脉注射生理盐水0.1 mL。以上4组均于第8周时拔除右侧下颌第一磨牙，浓缩生长因子组拔牙后于拔牙窝立即植入0.5 cm×0.5 cm浓缩生长因子；脂肪干细胞联合浓缩生长因子组拔牙后于拔牙窝立即植入0.5 cm×0.5 cm浓缩生长因子/脂肪干细胞复合物，对照组和唑来膦酸组拔牙后不处理；拔牙后8周过量麻醉处死大鼠，分别通过拔牙创观察、Micro-CT、苏木精–伊红染色评估牙龈再生、拔牙创周围骨组织再生情况。

结果与结论：相对于其他3组，浓缩生长因子/脂肪干细胞复合物明显促进了拔牙创周围软组织愈合和新骨形成，减少了死骨形成量，有效预防了双膦酸盐类药物相关性颌骨骨坏死的发生。

关键词：干细胞；脂肪干细胞；双膦酸盐；颌骨；骨坏死；浓缩生长因子；骨再生；大鼠

缩略语：双膦酸盐类药物相关性颌骨骨坏死：bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws，BRONJ

Adipose-derived stem cells integrated with concentrated growth factors prevent bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in SD rats

Zhang Shengmin[1], Cao Changhong[1], Liu Chao[2]

[1]Department of Stomatology, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, Hebei Province, China; [2]Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong Province, China

Zhang Shengmin, Master, Lecturer, Attending physician, Department of Stomatology, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, Hebei Province, China

Corresponding author: Liu Chao, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw may involve invasive dental surgery, infection, jaw injury, immunosuppressive agents and chemotherapeutic drugs, and its potential mechanism and treatment are not clear. Prevention is the main clinical proposition.

[1] 沧州医学高等专科学校口腔系，河北省沧州市 061001；[2] 山东大学齐鲁医院口腔颌面外科，山东省济南市 250012

第一作者：张圣敏，女，1985 年生，河北省沧州市人，汉族，2012 年天津医科大学毕业，硕士，讲师，主治医师，主要从事骨组织工程研究。

通讯作者：刘超，山东大学齐鲁医院口腔颌面外科，山东省济南市 250012

https://orcid.org/0000-0003-4520-3031(张圣敏)

基金资助：沧州市科技计划项目 (183302068)，项目负责人：张圣敏

引用本文：张圣敏，曹长红，刘超 . 浓缩生长因子负载脂肪干细胞预防 SD 大鼠双膦酸盐类药物相关性颌骨骨坏死 [J]. 中国组织工程研究，2021，25(19):2982-2987.

OBJECTIVE: To explore the preventive effect of concentrated growth factors integrated with adipose-derived stem cells on bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw.

METHODS: Forty Sprague-Dawley rats were randomly assigned to four groups: control group, zoledronic acid group, concentrated growth factor group, and adipose-derived stem cells combined with concentrated growth factor group (*n*=10 per group). Except the control group, rats in the other three groups were injected with zoledronic acid (80 μg/kg) through the tail vein once a week for 12 consecutive weeks to establish a bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw model. Rats in the control group were injected with 0.1 mL of saline through the tail vein. The right mandibular first molar was extracted at the 8th week. In the concentrated growth factor group, 0.5 cm × 0.5 cm concentrated growth factors were implanted immediately after tooth extraction. In the adipose-derived stem cells combined with concentrated growth factor group, 0.5 cm × 0.5 cm concentrated growth factor/adipose-derived stem cell complex was implanted into the extraction socket immediately after tooth extraction. The control group and zoledronic acid group were not treated after tooth extraction. The rats were killed 8 weeks after extraction. The gingival regeneration and bone tissue regeneration around the extraction wound were detected by observation of tooth extraction wound, Micro-CT and hematoxylin-eosin staining.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with other three groups, concentrated growth factor/adipose-derived stem cell complex significantly promoted the healing of soft tissue and new bone formation around tooth extraction, reduced the dead bone formation, and effectively prevented the occurrence of bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw.

Key words: stem cells; adipose derived stem cells; bisphosphonates; jaw bone; osteonecrosis; concentrated growth factor; bone regeneration; rats

Funding: *the Cangzhou Municipal Science and Technology Project, No. 183302068 (to ZSM)*

How to cite this article: *ZHANG SM, CAO CH, LIU C. Adipose-derived stem cells integrated with concentrated growth factors prevent bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in SD rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2021;25(19):2982-2987.*

0 引言 Introduction

双膦酸盐类药物相关性颌骨骨坏死 (bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws，BRONJ) 的特征是保持在 8 周以上且未表现出好转的骨坏死，目前或曾经有过双膦酸盐治疗史，但没有头颈部放疗史 [1]。双膦酸盐是一类人工合成的焦膦酸盐类似物，其作用在于抑制破骨细胞功能、抗骨质吸收，目前临床主要用于预防与治疗恶性肿瘤骨转移，防治肿瘤相关性骨丢失，抗肿瘤以及治疗骨质疏松症、Paget 病等。BRONJ 与大剂量双膦酸盐使用有关，属于药物相关的颌骨骨坏死的一种类型，其中唑来膦酸的发病率最高 [2]。唑来膦酸是双膦酸盐的一种类型 (商品名为择泰)。通过静脉注射双膦酸盐的患者，比口服双膦酸盐患者的骨坏死率更高。拔牙引起的颌骨和牙周组织损伤是诱发 BRONJ 发生的重要因素 [3]。临床尚无标准化 BRONJ 治疗方案，原则为去除死骨及抗炎等对症治疗 [4]，保守治疗预后较差 [5]。因此，现阶段临床对于 BRONJ 多主张预防为主。为有效预防拔牙术后 BRONJ 的发生，临床多采用拔牙术后创口早期关闭 [6-9]、高压氧治疗 [10-11]、干细胞疗法 [12-13]、生长因子等操作 [14-15]，但临床数据较少，难以达成共识。

浓缩生长因子是 2006 年推出的第 3 代血小板浓缩物 [16]，含有比第 1 代富血小板血浆和第 2 代富血小板纤维蛋白更高的生长因子，并具有更硬的纤维蛋白结构。浓缩生长因子是一种结构疏松、弹性好、可塑性强、富含多种生长因子的三维网络聚合物，为干细胞增殖和分化提供了可靠的微环境。脂肪干细胞是一种具有多种分化潜能和免疫调节能力的种子细胞。课题组前期研究证明，在聚乳酸表面形成纳米柱阵列能有效促进脂肪干细胞的成骨分化 [17]。脂肪干细胞也可作为种子细胞用于预防和治疗 BRONJ[18-19]，研究浓缩生长因子 / 脂肪干细胞组织工程复合物用于预防 BRONJ 的发生，有着极大的可行性。

该研究在拔除 SD 大鼠右侧下颌第一磨牙后于拔牙窝立即植入浓缩生长因子 / 脂肪干细胞复合物，探讨浓缩生长因子负载脂肪干细胞对 BRONJ 的全面预防作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 基础实验与动物实验在沧州医学高等专科学校科技实训中心完成，苏木精－伊红染色在山东大学齐鲁医院完成，实验周期为 2019 年 9 月至 2020 年 5 月。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选用 8 周龄雌性 SD 大鼠 42 只，体质量 200–220 g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，动物合格证编号：SCXK-(京)2016-0006，SPF 级。动物研究按照山东大学动物保护与伦理委员会的意见进行。所有动物标准条件下饲养，适应性饲养 7 d 后进行实验。

1.3.2 实验试剂 唑来膦酸 (上海陶塑生化科技有限公司)；10% 水合氯醛 (天津索罗门生物科技有限公司)；胎牛血清、DMEM、Ⅰ型胶原酶、胰酶 (Gibco 公司)；碱性磷酸酶染色试剂盒 (碧云天生物技术有限公司)；茜素红染色试剂盒 (Solarbio 公司)；β－甘油磷酸钠、维 C 磷酸酯、地塞米松 (Sigma 公司)；RNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司)；cDNA 第一链合成试剂盒 (天根生化科技有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 浓缩生长因子培养液的制备 从 1 只健康 SD 大鼠的心脏血液中提取浓缩生长因子。腹腔注射 10% 水合氯醛 (3 mL/kg) 麻醉供体大鼠，通过心脏穿刺直接将血液提取到无抗凝血剂的无菌管中，并立即在特殊的离心设备 (Medifuge 离心机) 中离心约 13 min，去除上血清层和下红细胞层，保留中间浓缩生长因子，PBS 冲洗，加入至 5 mL 注射器，按 15% 的比例推注到 DMEM 培养液中 [20]，得到含浓缩生长因子的 DMEM 培养液。用含 15% 浓缩生长因子的 DMEM 培养液培养脂肪干细胞。

1.4.2 SD 大鼠脂肪干细胞的提取 选取 1 只 SD 大鼠，分离腹股沟处脂肪组织，置于含 5% 抗生素的 PBS 中，去除肉眼可见的结缔组织，然后放入 10 cm 培养皿中剪碎，将剪碎后的脂肪组织放入 15 mL 离心管中，加入 0.1% Ⅰ型胶原酶 37 ℃消化 60 min，加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养

液，1 000 r/min 离心 10 min，弃上清，加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬，放入 10 cm 培养皿，在 37 ℃、体积分数为 5%CO_2 培养箱培养，72 h 首次换液，之后每 3 d 换液 1 次，达 80% 融合时传代。

脂肪干细胞的培养及鉴定	
细胞来源：	SD 大鼠腹股沟处脂肪组织
原代培养方法：	Ⅰ型胶原酶消化法
基础培养基：	低糖 DMEM 培养液
添加材料：	体积分数 10% 胎牛血清、青霉素、链霉素、浓缩生长因子
原代培养时间：	原代细胞培养 3 d 换液，之后每隔 2 d 换液 1 次，原代培养大约 7 d 开始传代
细胞传代：	细胞融合至 80% 用胰酶消化传至下 1 代，按 1 ∶ 3 比例传代，两三天传 1 代，取 3–5 代细胞进行实验
细胞鉴定：	流式细胞术进行细胞鉴定
伦理学批准：	该实验经过山东大学齐鲁医院科研伦理委员会批准

1.4.3 细胞增殖实验 将第 3 代脂肪干细胞浓度调整为 2×10^7 L^{-1}，按每孔 100 μL 加入到 96 孔板中，用含 15% 浓缩生长因子的 DMEM 培养液培养，对照组不加入浓缩生长因子，每组设置 3 个复孔，每 3 d 换液 1 次。在培养第 1，3，5，7 天相同时间点在孔板中加入 10 μL CCK-8 溶液，培养箱孵育 2 h，采用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度值。

1.4.4 成骨分化 将第 3 代脂肪干细胞浓度调整为 5×10^6 L^{-1}，按每孔 1 mL 加入到 24 孔板中，用 DMEM 培养液孵育 72 h，加入含 15% 浓缩生长因子的 DMEM 成骨诱导培养液 (10 mmoL/L β− 甘油磷酸钠、0.05 g/L 维生素 C、0.1 μmoL/L 地塞米松)，对照组仅加入成骨诱导培养液。诱导后 7 d 进行碱性磷酸酶染色，诱导后 14 d 进行茜素红染色。

1.4.5 成骨基因表达 将第 3 代脂肪干细胞浓度调整为 5×10^6 L^{-1}，按每孔 1 mL 加入到 24 孔板中，用 DMEM 培养液孵育 72 h 后，加入含 15% 浓缩生长因子的 DMEM 成骨诱导培养液培养，对照组仅加入成骨诱导培养液。培养第 5，8 天，RNA 提取试剂盒提取细胞 mRNA，用 cDNA 第一链合成试剂盒将 2 μg 总 mRNA 合成 cDNA，然后用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 进行 RT-PCR 定量分析。引物序列 (5'–3')：① RUNX-2：F，ATC ATT CAG TGA CAC CAC CA；R，GTA GGG GCT AAA GGC AAA AG；② OCN：F，CAG ACA AGT CCC ACA CAG CA；R，CCA GCA GAG TGA GCA GAG AG；③ OPN：F，TGG CCC TGA CTG CAT TCT GC；R，GCT GTG CCG TCC ATA CTT TCG；④ β-actin：F，CCT CTA TGA CAA CAC AGT；R，AGC CAC CAA TCC ACA CAG。每组设置 3 个复孔，每孔重复测量 3 次，取平均值进行分析。

1.4.6 浓缩生长因子 / 脂肪干细胞复合物的制备 制取浓缩生长因子，将其在培养皿中压成片状，手术刀切取浓缩生长因子为 0.5 cm×0.5 cm；将第 3 代脂肪干细胞悬液按 1 000 r/min 离心 10 min，弃去上清液，加入 DMEM 培养液重悬细胞，浓度调整为 5×10^8 L^{-1}。将 20 μL 脂肪干细胞悬液滴加入浓缩生长因子中，制成浓缩生长因子 / 脂肪干细胞复合物备用，大鼠拔牙后，立即植入浓缩生长因子 / 脂肪干细胞复合物。

1.4.7 BRONJ 的建模过程 实验动物随机分为 4 组：对照组、唑来膦酸组、浓缩生长因子组、脂肪干细胞联合浓缩生长因子组，每组 10 只。除对照组外，其他 3 组尾静脉注射唑来膦酸 (80 μg/kg)，每周 1 次，连续给药 12 周；对照组尾静脉注射生理盐水 0.1 mL 替代唑来膦酸，连续注射 12 周。以上 4 组均于第 8 周时拔除右侧下颌第一磨牙，浓缩生长因子组拔牙后于拔牙窝立即植入 0.5 cm×0.5 cm 浓缩生长因子；脂肪干细胞联合浓缩生长因子组拔牙后于拔牙窝立即植入 0.5 cm×0.5 cm 浓缩生长因子 / 脂肪干细胞复合物，对照组和唑来膦酸组拔牙后不处理；拔牙窝缝合，避免移植物脱落；拔牙后 8 周过量麻醉处死大鼠，进行后续检测。

1.4.8 苏木精－伊红染色 取大鼠牙槽窝周围骨组织，脱钙后，石蜡包埋处理，切片厚度为 30 μm，切片后用丙醇和乙醇混合液 (1 ∶ 1) 清洗，苏木精－伊红染色，显微镜下观察。

1.4.9 Micro CT 观察 取下颌骨在 40 g/L 多聚甲醛中固定 24 h，用 Micro-CT 成像系统 (Bruker SkyScan2211，比利时) 扫描。将感兴趣区域定义为拔牙窝周围，然后通过 MIMICS20.0 (Materialise，比利时) 对图像三维重构并进行拔牙窝观察。

1.4.10 拔牙窝愈合情况 将拔牙窝愈合定义为无肉眼可见的明显拔牙窝，黏膜完全覆盖，无肉眼可见的死骨裸露，苏木精－伊红染色显示有明显的新生骨形成，无明显炎症及骨陷窝，以上为拔牙窝愈合标准，并计算拔牙窝愈合率。

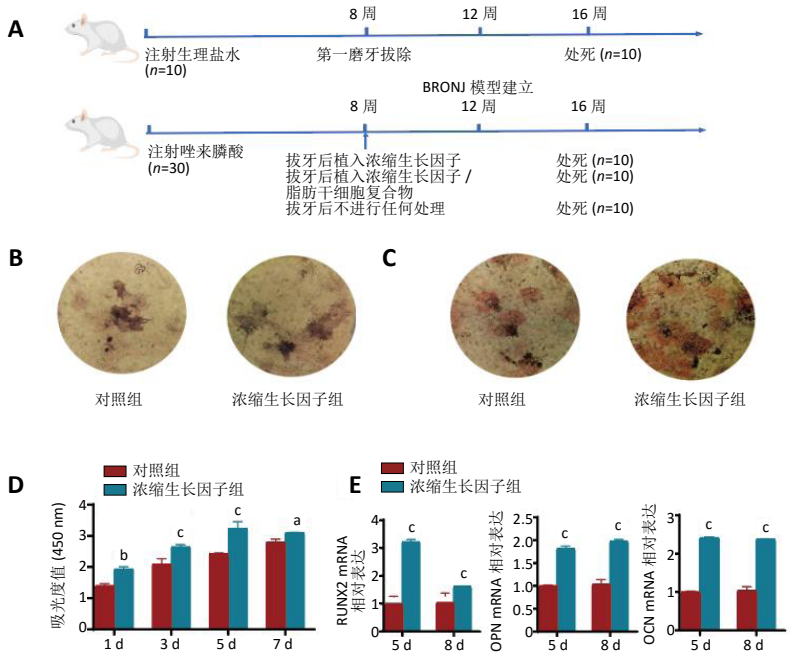
1.5 主要观察指标 拔牙窝愈合情况，苏木精－伊红染色观察骨再生情况。

1.6 统计学分析 利用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计学处理，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组内比较采用重复测量方差分析，两组间比较采用 t 检验，$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 浓缩生长因子对大鼠脂肪干细胞增殖、成骨分化的影响 见**图 1**。对第 3 代大鼠脂肪干细胞增殖能力检测发现，与对照组比较，含 15% 浓缩生长因子的 DMEM 培养液培养的脂肪干细胞增殖能力显著增强，第 1，3，5 天增殖能力最强，第 7 天增殖能力有所下降；与对照组比较，成骨诱导第 5，8 天时，浓缩生长因子显著增强成骨基因 RUNX2、OCN、OPN 的表达 ($P < 0.05$)，但第 8 天时 RUNX2 的表达水平显著下降，这与浓缩生长因子的降解性有很大关系。成骨诱导第 7 天时浓缩生长因子组碱性磷酸酶染色明显加深，成骨诱导第 14 天时浓缩生长因子组茜素红染色明显加深。

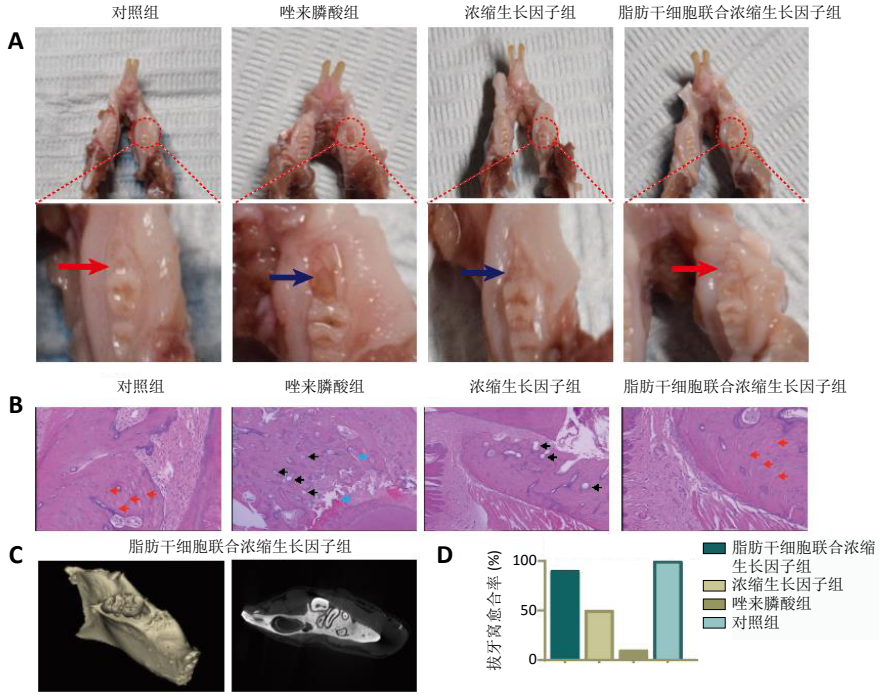
2.2 浓缩生长因子 / 脂肪干细胞局部移植促进牙龈伤口愈合并降低 BRONJ 样病变的发生 拔牙后 8 周，与唑来膦酸组和浓缩生长因子组相比，脂肪干细胞联合浓缩生长因子组和对照组均显示出拔牙窝软组织覆盖率高，未见坏死骨暴露，见**图 2A**；唑来膦酸组可见明显的死骨裸露，唑来膦酸组仅有 1 只大鼠拔牙创愈合较好；浓缩生长因子组部分拔牙窝愈合较好，也有部分出现拔牙窝愈合不良，大体可见少量死骨裸露。



图注：图中 A 为实验流程示意图；B，C 分别为成骨诱导第 7 天碱性磷酸酶染色 (×200) 和成骨诱导第 14 天茜素红染色 (×200)，浓缩生长因子组染色明显加深；D 为浓缩生长因子可显著促进脂肪干细胞的增殖；E 为浓缩生长因子增强脂肪干细胞成骨基因 RUNX2、OCN、OPN 的表达。与对照组比较，$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$，$^{c}P < 0.001$。BRONJ：双膦酸盐类药物相关性颌骨骨坏死

图 1 | 浓缩生长因子对大鼠脂肪干细胞增殖、成骨分化的影响

Figure 1 | Effect of concentrated growth factors on proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells in rats



图注：图中 A 为脂肪干细胞联合浓缩生长因子组和对照组拔牙创牙龈组织基本愈合，唑来膦酸组牙龈组织无法愈合，有死骨裸露，浓缩生长因子组牙龈组织部分愈合，少量死骨裸露 (红色箭头指向基本愈合的拔牙窝，蓝色箭头指向裸露的死骨)；B 为大鼠拔牙后 8 周硬组织苏木精 - 伊红染色 (×200) 显示脂肪干细胞联合浓缩生长因子组空骨陷窝比例较低 (黑色箭头)，可见较多新生骨 (红色箭头)；浓缩生长因子组和唑来膦酸组可见到明显的骨坏死、骨陷窝 (黑色箭头)、胶原纤维断裂 (蓝色箭头)；C 为拔牙后 8 周 Micro-CT 检查显示脂肪干细胞联合浓缩生长因子组拔牙窝大多被再生骨占据，拔牙窝基本愈合；D 为各组拔牙窝愈合率

图 2 | 浓缩生长因子 / 脂肪干细胞对大鼠拔牙创及骨组织愈合的影响

Figure 2 | Effect of concentrated growth factors/adipose-derived stem cells on tooth extraction wound and bone tissue healing in rats

对照组、唑来膦酸组、浓缩生长因子组、脂肪干细胞联合浓缩生长因子组拔牙窝愈合率分别为 100%，10%，50%，90%，见**图 2D**。

2.3 浓缩生长因子 / 脂肪干细胞局部移植促进骨再生并降低 BRONJ 样病变的发生 拔牙后 8 周组织学分析 (苏木精 - 伊红染色) 显示脂肪干细胞联合浓缩生长因子组和对照组空骨陷窝比例低，可见较多新生骨；浓缩生长因子组可见到明显的骨坏死和骨陷窝，唑来膦酸组可见明显的骨坏死、骨陷窝及胶原纤维断裂，见**图 2B**；Micro-CT 检查显示脂肪干细胞联合浓缩生长因子组拔牙窝大多被再生骨占据，拔牙创基本愈合，见**图 2C**。

3 讨论 Discussion

BRONJ 自 2003 年被首次报道以来，关于其临床治疗方案仍存在争议，更多主张预防为主。依据 BRONJ 颌骨坏死的临床诊断，服用双膦酸盐类药物且排除放射治疗的患者，在拔牙后 8 周创口不愈合可诊断为 BRONJ[1]。该研究选择 SD 大鼠构建 BRONJ 模型，于拔牙后 8 周观察创口不愈合，有死骨形成，苏木精 - 伊红染色显示骨陷窝和死骨显著性增加。

根据近来研究报道，拔牙和外科手术的正确操作可以有效预防 BRONJ，甚至在高危患者中也可发挥作用。不同的拔牙后处理可能成为 BRONJ 潜在的预防策略 [21-22]。在一些临床研究中，使用自体生物材料作为生物支架进行 BRONJ 的预防，如使用富血小板血浆可有效缓解 BRONJ 的发生 [15]，ALONSO-RODRIGUEZ 等 [18] 应用可吸收止血明胶海绵负载脂肪干细胞填塞拔牙窝，同时颊黏膜骨膜瓣覆盖预防 BRONJ；ZANG 等 [19] 利用脂肪干细胞结合羟基磷灰石填塞拔牙术后牙槽窝预防兔 BRONJ。对有双膦酸盐治疗史的患者，在拔牙或其他牙槽手术后，采用必要措施预防 BRONJ 的发生尤其重要。

第 3 代血小板浓缩生长因子比第 2 代浓缩血小板和第 1 代浓缩血小板具有更高的生长因子浓度和更好的再生能

力[23-24]。该研究比较了浓缩生长因子对脂肪干细胞的成骨作用。首先将脂肪干细胞用含浓缩生长因子的成骨诱导液培养，碱性磷酸酶染色、茜素红染色及成骨基因表达发现成骨潜能显著高于对照组，证实了浓缩生长因子对脂肪干细胞的成骨诱导作用。浓缩生长因子对比格犬脂肪干细胞[25]、比格犬牙周膜干细胞[26]、人牙乳头干细胞的成骨作用也被其他研究者所证实[27]。该实验在拔牙术后将浓缩生长因子/脂肪干细胞复合物即刻植入牙槽窝，苏木精-伊红染色及Micro CT均显示其可显著促进拔牙窝新骨形成，这些结果说明浓缩生长因子作为一种生物材料，可以承载脂肪干细胞并分泌生长因子，从而促进新骨形成并有效预防BRONJ。浓缩生长因子/脂肪干细胞复合物促进成骨的机制可能与以下因素有关：浓缩生长因子具备三维聚合物的网络式纤维蛋白结构，可为生长因子诱导组织修复与再生提供可靠支架；浓缩生长因子富含多种生长因子[16]：血管内皮生长因子、类胰岛素生长因子、血小板衍生生长因子、转化生长因子β、成纤维细胞生长因子以及表皮生长因子，其中转化生长因子β、血小板衍生生长因子、类胰岛素生长因子有着明显促进成骨的作用[28-31]，血管内皮生长因子、转化生长因子β均为已知的血管生成刺激因子[32-33]，而血管再生对骨再生具有重要的意义。富血小板纤维蛋白应用于治疗BRONJ也具有一定的效果[14]。然而，浓缩生长因子比富血小板纤维蛋白含有更多的血小板衍生生长因子[34]、血管内皮生长因子等生长因子[35]，含有更多的CD34阳性细胞[36]，且由于浓缩生长因子具有更坚硬的纤维蛋白结构[35]，因此可以认为浓缩生长因子是BRONJ的一种潜在治疗和预防方式。

在体内研究中发现，单独浓缩生长因子组不能显著发挥预防作用，其可能原因为：浓缩生长因子降解较快，所富含的生长因子会在短时间内释放，因此其对骨骼愈合的过程主要集中在刚开始治疗时，却难以维持长时间的有效作用[37]；同时由于BRONJ导致周围死骨形成，而双膦酸盐会抑制周围干细胞活性[38]，使干细胞难以在生长因子诱导下发挥作用，浓缩生长因子借助外来脂肪干细胞的多向分化潜能便可以发挥更持久的作用。

血管新生是创口愈合的首要要求。KUROSHIMA等[39]通过尾静脉注射外周血单个核细胞，增强拔牙窝结缔组织中的新血管形成，促进软组织愈合从而减少BRONJ样病变。血液的供应有利于成骨，已有研究表明，在骨缺损愈合过程中，血管生成发生在骨生成之前，并且血管生成和骨生成对骨再生具有相辅相成的作用[40]。血管内皮生长因子刺激血管生成，这是骨再生过程中的一个重要步骤，浓缩生长因子中包含大量的血管内皮生长因子，可能对浓缩生长因子预防BRONJ发生发挥了重要作用。但在该研究中，对于浓缩生长因子是否能直接刺激脂肪干细胞成血管分化的体外研究和体内研究并没有完全展开，会在以后的研究中进行充实。

结论： 该研究发现拔牙同期在拔牙窝填塞浓缩生长因子/脂肪干细胞复合物可通过促进骨组织修复有效减少BRONJ发病率，为BRONJ的预防提供了新思路。另外，浓缩生长因子可以选用自体来源，可自发降解且绝对安全。

作者贡献： 实验设计、评估为刘超，实验实施为张圣敏，资料收集为曹长红。

经费支持： 该文章接受了“沧州市科技计划项目(183302068)”的资助。所有作者声明，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。

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。

机构伦理问题： 实验方案经山东大学齐鲁医院科研伦理委员会批准，批准号为KYLL-2016(KS)-006。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南： 该研究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》。

文章查重： 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审： 文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明： 文章统计学方法已经通过沧州医学高等专科学校统计学专家审核。

4 参考文献 References

[1] ADVISORY TASK FORCE ON BISPHOSPHONATE-RELATED OSTENONECROSIS OF THE JAWS, AMERICAN ASSOCIATION OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGEONS. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. J Oral Maxillofac Surg. 2007;65(3):369-376.

[2] MAVROKOKKI T, CHENG A, STEIN B, et al. Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. J Oral Maxillofac Surg. 2007;65(3):415-423.

[3] SAKAGUCHI O, KOKURYO S, TSURUSHIMA H, et al. Lipopolysaccharide aggravates bisphosphonate-induced osteonecrosis in rats. Int J Oral Maxillofac Surg. 2015;44(4):528-534.

[4] MARX RE, SAWATARI Y, FORTIN M, et al. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. J Oral Maxillofac Surg. 2005; 63(11):1567-1575.

[5] FLIEFEL R, TRÖLTZSCH M, KÜHNISCH J, et al. Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. Int J Oral Maxillofac Surg. 2015;44(5):568-585.

[6] MATSUMOTO A, SASAKI M, SCHMELZEISEN R, et al. Primary wound closure after tooth extraction for prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw in patients under denosumab. Clin Oral Investig. 2017;21(1):127-134.

[7] RISTOW O, RÜCKSCHLOß T, BODEM J, et al. Double-layer closure techniques after bone surgery of medication-related osteonecrosis of the jaw- A single center cohort study. J Craniomaxillofac Surg. 2018;46(5):815-824.

[8] NONNENMÜHLEN N, BURNIC A, BARTELLA A, et al. Comparison of mucosal and mucoperiosteal wound cover for the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw lesions: a retrospective cohort study. Clin Oral Investig. 2019;23(1):351-359.
[9] HASEGAWA T, KAWAKITA A, UEDA N, et al. A multicenter retrospective study of the risk factors associated with medication-related osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in patients receiving oral bisphosphonate therapy: can primary wound closure and a drug holiday really prevent MRONJ? Osteoporos Int. 2017;28(8):2465-2473.
[10] LIU SS, LIN TY, FU E, et al. Immediate hyperbaric oxygen after tooth extraction ameliorates bisphosphonate-related osteonecrotic lesion in rats. J Periodontol. 2019;90(12):1449-1456.
[11] SILVA ML, TASSO L, AZAMBUJA AA, et al. Effect of hyperbaric oxygen therapy on tooth extraction sites in rats subjected to bisphosphonate therapy-histomorphometric and immunohistochemical analysis. Clin Oral Investig. 2017;21(1):199-210.
[12] VOSS PJ, MATSUMOTO A, ALVARADO E, et al. Treatment of stage II medication-related osteonecrosis of the jaw with necrosectomy and autologous bone marrow mesenchymal stem cells. Odontology. 2017;105(4):484-493.
[13] OGATA K, KATAGIRI W, OSUGI M, et al. Evaluation of the therapeutic effects of conditioned media from mesenchymal stem cells in a rat bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like model. Bone. 2015;74:95-105.
[14] VALENTE NA, CHATELAIN S, ALFONSI F, et al. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: The Use of Leukocyte-Platelet-Rich Fibrin as an Adjunct in the Treatment. J Craniofac Surg. 2019;30(4):1095-1101.
[15] CARDOSO CL, CURRA C, CURI MM, et al. Treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis using platelet-rich plasma: microtomographic, microscopic, and immunohistochemical analyses. Braz Oral Res. 2019; 33:e050.
[16] QIAO J, AN N, OUYANG X. Quantification of growth factors in different platelet concentrates. Platelets. 2017;28(8):774-778.
[17] ZHANG S, MA B, LIU F, et al. Polylactic Acid Nanopillar Array-Driven Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells Determined by Pillar Diameter. Nano Lett. 2018;18(4):2243-2253.
[18] ALONSO-RODRIGUEZ E, GONZÁLEZ-MARTÍN-MORO J, CEBRIÁN-CARRETERO JL, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis. Application of adipose-derived stem cells in an experimental murine model. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2019;24(4):e529-e536.
[19] ZANG X, HE L, ZHAO L, et al. Adipose-derived stem cells prevent the onset of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw through transforming growth factor β-1-mediated gingival wound healing. Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):169.
[20] 陈霞 . 自体浓缩生长因子 (CGF) 促进 BMSCs 成骨的研究 [D]. 上海 : 上海交通大学 ,2017.
[21] HEUFELDER MJ, HENDRICKS J, REMMERBACH T, et al. Principles of oral surgery for prevention of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2014;117(6):e429-435.
[22] OTTO S, TRÖLTZSCH M, JAMBROVIC V, et al. Tooth extraction in patients receiving oral or intravenous bisphosphonate administration: A trigger for BRONJ development? J Craniomaxillofac Surg. 2015;43(6):847-854.
[23] KIM TH, KIM SH, SÁNDOR GK, et al. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. Arch Oral Biol. 2014;59(5):550-558.
[24] 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.
[25] CHEN X, WANG J, YU L, et al. Effect of Concentrated Growth Factor (CGF) on the Promotion of Osteogenesis in Bone Marrow Stromal Cells (BMSC) in vivo. Sci Rep. 2018;8(1):5876.
[26] YU B, WANG Z. Effect of concentrated growth factors on beagle periodontal ligament stem cells in vitro. Mol Med Rep. 2014;9(1): 235-242.
[27] 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.
[28] ELÇIN AE, PARMAKSIZ M, DOGAN A, et al. Differential gene expression profiling of human adipose stem cells differentiating into smooth muscle-like cells by TGFβ1/BMP4. Exp Cell Res. 2017;352(2):207-217.
[29] GALLEGO-MUÑOZ P, IBARES-FRÍAS L, VALSERO-BLANCO MC, et al. Effects of TGFβ1, PDGF-BB, and bFGF, on human corneal fibroblasts proliferation and differentiation during stromal repair. Cytokine. 2017; 96:94-101.
[30] CARANO RA, FILVAROFF EH. Angiogenesis and bone repair. Drug Discov Today. 2003;8(21):980-989.
[31] RINDONE AN, KACHNIARZ B, ACHEBE CC, et al. Heparin-Conjugated Decellularized Bone Particles Promote Enhanced Osteogenic Signaling of PDGF-BB to Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Engineered Bone Grafts. Adv Healthc Mater. 2019;8(10):e1801565.
[32] WINET H. The role of microvasculature in normal and perturbed bone healing as revealed by intravital microscopy. Bone. 1996;19(1 Suppl): 39S-57S.
[33] SURESH V, WEST JL. 3D Culture Facilitates VEGF-Stimulated Endothelial Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells. Ann Biomed Eng. 2020; 48(3):1034-1044.
[34] 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.
[35] PARK HC, KIM SG, OH JS, et al. Early Bone Formation at a Femur Defect Using CGF and PRF Grafts in Adult Dogs: A Comparative Study. Implant Dent. 2016;25(3):387-393.
[36] RODELLA LF, FAVERO G, BONINSEGNA R, et al. Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction. Microsc Res Tech. 2011;74(8):772-777.
[37] BONAZZA V, HAJISTILLY C, PATEL D, et al. Growth Factors Release From Concentrated Growth Factors: Effect of β-Tricalcium Phosphate Addition. J Craniofac Surg. 2018;29(8):2291-2295.
[38] POURGONABADI S, MOUSAVI SH, TAYARANI-NAJARAN Z, et al. Effect of zoledronate, a third-generation bisphosphonate, on proliferation and apoptosis of human dental pulp stem cells. Can J Physiol Pharmacol. 2018;96(2):137-144.
[39] KUROSHIMA S, NAKAJIMA K, SASAKI M, et al. Systemic administration of quality- and quantity-controlled PBMNCs reduces bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw-like lesions in mice. Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):209.
[40] GLOWACKI J. Angiogenesis in fracture repair. Clin Orthop Relat Res. 1998;(355 Suppl):S82-89.

(责任编辑：MZH，ZN，JY)