

富血小板纤维蛋白联合诱导骨基质修复兔口腔种植体周围骨缺损

<https://doi.org/10.12307/2022.485>
高玺鑫^{1,2,3}, 王溪¹, 范戌辉⁴, 崔怡⁴, 杨威⁴, 赵云转⁴

投稿日期: 2021-03-23

送审日期: 2021-02-25

采用日期: 2021-04-28

在线日期: 2021-10-15

中图分类号:

R459.9; R318; R783

文章编号:

2095-4344(2022)14-02207-07

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点—

△将富血小板纤维蛋白以不同比例和医用诱导骨基质混合应用,充分与骨缺损区相接触,更好地发挥其中多种生长因子的协同作用,促进骨形成。

△探讨最佳的富血小板纤维蛋白与医用诱导骨基质混合比例,以达到最佳的成骨效果,对临床应用具有指导意义。

富血小板纤维蛋白制备及医用诱导骨基质准备

建立兔双侧下颌骨骨缺损模型

植入种植体,将不同比例富血小板纤维蛋白及医用骨基质填入骨缺损中

结论:

- (1) 富血小板纤维蛋白和医用诱导骨基质联合应用时,随着富血小板纤维蛋白含量的增加,成骨效果更佳;
- (2) 富血小板纤维蛋白与医用诱导骨基质联合应用能加速种植体骨愈合。

造模后4, 8, 12周获取标本,行大体观察、X射线片检查、荧光显微镜检查、苏木精-伊红染色、亚甲基蓝酸性品红染色,计算骨形成率并进行统计学分析

文题释义:

富血小板纤维蛋白: 是自体血离心后的产物,其中未添加任何抗凝剂、激活物,富含生长因子、细胞因子,对软组织、骨组织再生具有积极作用。

医用诱导骨基质: 具有骨诱导活性的生物医用材料,其含有能诱导和促进骨生长的骨形成蛋白。骨形态发生蛋白诱导植入部位间充质细胞向成骨细胞方向分化,从而加速骨的生长。

摘要

背景: 富血小板纤维蛋白及人工骨材料已广泛应用于种植体周围骨缺损的修复及再生,但二者以不同比例混合应用于种植体周围成骨方面的研究较少。

目的: 探讨富血小板纤维蛋白与医用诱导骨基质联合应用,对兔种植体周围骨缺损再生修复的效果。

方法: 12只大耳白兔建立口腔种植体周围骨缺损模型,沿右侧下颌骨下缘制备直径为5 mm、深为2 mm的圆柱形骨缺损区共3个,自近中至远中依次编号为1, 2, 3号,置入钛螺钉后,分别填入富血小板纤维蛋白与骨基质2:1混合物、1:1混合物、1:2混合物;另一侧下颌骨相同操作制备3个骨缺损,自远中向近中编号依次为4, 5, 6号,分别置入钛螺钉,4号作为空白对照,5号填入富血小板纤维蛋白,6号填入骨基质。12只兔随机分为造模术后4, 8, 12周组,每组4只。各组分别随机选出1只兔,于处死前10 d注射盐酸四环素25 mg/kg,处死前3 d注射钙黄绿素5 mg/kg,进行荧光标记。分别于造模术后4, 8, 12周时处死动物,行大体观察、苏木精-伊红染色、荧光标记、甲苯胺蓝酸性品红染色,并对成骨效果进行统计学分析。

结果与结论: ①骨形成率大小依次为:富血小板纤维蛋白/医用诱导骨基质2:1>富血小板纤维蛋白/医用诱导骨基质1:1>富血小板纤维蛋白/医用诱导骨基质1:2>医用诱导骨基质>空白对照;②提示富血小板纤维蛋白与医用诱导骨基质均有良好的骨缺损修复效果;富血小板纤维蛋白和医用诱导骨基质联合应用时,随着富血小板纤维蛋白含量的增高,成骨效果更佳;富血小板纤维蛋白与医用诱导骨基质联合应用能加速种植体骨愈合。

关键词: 富血小板纤维蛋白; 医用诱导骨基质; 骨缺损; 种植体; 兔; 造模

Platelet-rich fibrin combined with induced bone matrix repairs bone defects around oral implants in rabbits

Gao Xixin^{1,2,3}, Wang Xi¹, Fan Xuhui⁴, Cui Yi⁴, Yang Wei⁴, Zhao Yunzhan⁴

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China; ²Hebei Stomatology Key Laboratory of Medicine, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China; ³Hebei Oral Disease Clinical Medicine Research Center, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China; ⁴Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

¹河北医科大学口腔医学(学)院口腔颌面外科,河北省石家庄市 050017; ²河北省口腔医学重点实验室,河北省石家庄市 050017; ³河北省口腔疾病临床医学研究中心,河北省石家庄市 050017; ⁴河北医科大学第二医院口腔颌面外科,河北省石家庄市 050000

第一作者: 高玺鑫,女,1989年生,河北省石家庄市人,汉族,2016年河北医科大学毕业,硕士,主治医师,主要从事种植相关骨再生研究。

通讯作者: 赵云转,博士,副教授,副主任医师,硕士生导师,河北医科大学第二医院口腔颌面外科,河北省石家庄市 050000

<https://orcid.org/0000-0003-3859-6658> (高玺鑫)

基金资助: 2015年省直(河北)医疗机构老年病防治科研项目,项目负责人:杨威;河北省医学科学研究课题计划(20210662),

项目负责人:赵云转

引用本文: 高玺鑫,王溪,范戌辉,崔怡,杨威,赵云转.富血小板纤维蛋白联合诱导骨基质修复兔口腔种植体周围骨缺损[J].

中国组织工程研究,2022,26(14):2207-2213.



Gao Xixin, Master, Attending physician, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China; Hebei Stomatology Key Laboratory of Medicine, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China; Hebei Oral Disease Clinical Medicine Research Center, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China

Corresponding author: Zhao Yunzhan, MD, Associate professor, Associate chief physician, Master's supervisor, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Abstract

BACKGROUND: Platelet-rich fibrin and artificial bone materials have been widely used in the repair and regeneration of peri-implant bone defects. However, there was a lack of research on the osteogenesis of the two materials in different proportions.

OBJECTIVE: To investigate the effect of platelet-rich fibrin combined with bone matrix on the regeneration of peri-implant bone defects in rabbits.

METHODS: A bone defect model around the oral implant was established in 12 large-ear white rabbits. Three cylindrical bone defect areas with a diameter of 5 mm and a depth of 2 mm were prepared along the lower edge of the right mandible, which were numbered 1–3 from the mesial to the distal. After placement of titanium screws, the 2:1, 1:1, and 1:2 mixtures of platelet-rich fibrin and bone matrix were used respectively to fill in the defects. Another three same bone defects were prepared along the lower edge of the left mandible, which were numbered 4–6 from the distal to the mesial. Titanium screw screws were placed, No. 4 defect was filled with nothing as a blank control, No. 5 was filled with platelet-rich fibrin, and No. 6 was filled with bone matrix. Twelve rabbits models were randomized into 4-, 8-, 12-week groups, with 4 rabbits in each group. One rabbit from each group was randomly selected, killed and fluorescently labeled. Tetracycline (25 mg/kg) and calcein (5 mg/kg) were subcutaneously administered at 10 and 3 days before death, respectively. Other animals were killed at 4, 8, and 12 weeks after modeling, and the osteogenic effect was statically analyzed by general observation, hematoxylin-eosin staining, fluorescent labeling, and methylene blue/acid fuchsin staining.

RESULTS AND CONCLUSION: Bone formation rate from high to low was: platelet rich fibrin/bone matrix 2:1 > platelet rich fibrin > platelet rich fibrin/bone matrix 1:1 > platelet rich fibrin/bone matrix 1:2 > bone matrix > blank control. Both platelet-rich fibrin and bone matrix have a good effect in bone repairing bone defect. When platelet rich fibrin and medical induced bone matrix are used in combination, the osteogenic effect becomes better with the increase of platelet-rich fibrin concentration. The combined application of platelet-rich fibrin and bone matrix can accelerate bone healing of implants.

Key words: platelet-rich fibrin; bone matrix; bone defect; implant; rabbit; modeling

Funding: 2015 Hebei Provincial Scientific Research Project for Geriatric Disease Prevention and Control (to YW); Hebei Medical Science Research Project, No. 20210662 (to ZYZ)

How to cite this article: GAO XX, WANG X, FAN XH, CUI Y, YANG W, ZHAO YZ. Platelet-rich fibrin combined with induced bone matrix repairs bone defects around oral implants in rabbits. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2022;26(14):2207-2213.

0 引言 Introduction

组织工程学在口腔种植方面的研究主要集中在种植体周围骨再生、相关生长因子和信号通路调控、骨与软组织的种子细胞与支架材料、组织工程技术增强的各种骨增量技术等领域^[1]。20世纪70年代人类即发现了血小板的再生潜能，血小板被激活后能够释放大量的生长因子，有助于胶原蛋白产生、细胞有丝分裂、血管生长及其他细胞对损伤部位的趋化和细胞分化，在骨缺损的修复及软组织再生过程中均发挥着重要作用^[2]。

富血小板纤维蛋白作为第2代血小板浓缩制品，于2000年首次由CHOUKROUN等^[3]将自体血离心后获得，其中未添加任何抗凝剂、激化物。富血小板纤维蛋白是一个富含生长因子、细胞因子，并可在一定时间后再吸收的膜释放纤维蛋白基质^[4]。生长因子是一类天然生物递质，通过结合特定的细胞表面受体调节细胞增殖、趋化、分化和基质合成等组织再生过程^[5]。这些生长因子在不同时间释放，呈天然比例，在成骨细胞的分化、增殖、黏附、矿化过程中相互作用，相辅相成。纤维蛋白是一种桥联分子，使一系列细胞相互作用并提供一个临时基质，细胞可以增殖、组织和履行职能，主要是机体损伤处的炎症反应。纤维蛋白还可以为成纤维细胞和血管内皮细胞的迁移提供基质，参与血管生成过程，促进组织的愈合^[6]。富血小板纤维蛋白中含有白细胞、纤维基质及多种生长因子，而这些物质不仅在骨修复、骨再生过程中起关键作用，在抗炎及促进软组织愈合过程中也至关重要。富血小板纤维蛋白的细胞增殖作用不仅限于成骨细胞，而是多种类型，包括牙周膜细胞、成骨细胞、牙龈成纤维细胞、口腔上皮细胞、骨髓间充质干细胞，脂肪细胞、前角蛋白细胞等^[7-9]。

医用诱导骨基质(金骨威)，是由猪骨中提取并纯化的骨形态发生蛋白和诱导性骨基质载体复合而成、具有骨诱导活性的生物医用材料，其含有能诱导和促进骨生长的骨形态发生蛋白^[10]，可诱导植入部位间充质细胞向成骨细胞方向分化，从而加速骨的生长^[11]。此次研究以家兔下颌骨种植体周围骨缺损为实验模型，通过植入医用诱导骨基质与不同比例富血小板纤维蛋白的混合物，探讨二者联合应用对种植体周围骨缺损的成骨效果。

1 材料和方法 Materials and methods

- 1.1 设计 随机对照动物实验，多个均数比较采用方差分析。
- 1.2 时间及地点 实验于2014年9月至2015年12月于河北医科大学第二医院实验室完成。
- 1.3 材料
 - 1.3.1 实验动物 成年雄性新西兰大耳白兔12只，体质量约3 kg，由河北医科大学第二医院实验动物中心提供，实验动物许可证号：SCXK(冀)2013-1-003。
 - 1.3.2 试剂、仪器 四环素(北京百灵威科技有限公司)，钙黄绿素(Fluka, 波兰)，钛螺钉(西安中邦钛生物材料有限公司)，医用诱导骨基质(上海骁博科技发展有限公司)，台式离心机(VRera 80-2型, 中国)，牙片机(KODAK, 美国)，硬组织切片机(Leica SP 1600 Leica Micosystem Wetzlar, 德国)，荧光显微镜(Olympus, 日本)，光学显微镜(Olympus BX61, 日本)。
- 1.4 实验方法 12只兔根据随机数字表随机分为术后4, 8, 12周组，每组4只。
 - 1.4.1 富血小板纤维蛋白制备及医用诱导骨基质准备 兔双耳脱毛去皮，一侧耳中动脉采血5 mL×4共20 mL，置于无菌真空空白采血管中，3 000 r/min，离心8 min，静置5 min后

可见采血管内血液分为3层，最上层血浆层，最下层破碎红细胞层，中间胶冻状即为富血小板纤维蛋白。完整取出富血小板纤维蛋白凝胶，放置于干净纱布，轻轻按压形成富血小板纤维蛋白膜，见图1A、B，小剪刀将富血小板纤维蛋白膜剪碎。医用诱导骨基质与生理盐水充分混合浸泡至柔软半透明，无菌纱布吸干多余水分，见图1C。

1.4.2 骨缺损的制备 同一只兔，选择另一侧耳的耳缘静脉给予3%戊巴比妥钠1 mL/kg麻醉后，双侧下颌脱毛备皮，2%盐酸利多卡因行局部浸润麻醉，沿右侧下颌骨下缘切开皮肤，皮下组织、肌层直至骨膜，切口长约3 cm，暴露术区，用直径为5 mm的平台钻于距离下颌骨下缘上2 mm处制备直径5 mm、深2 mm的圆柱形骨缺损区共3个，期间生理盐水降温。3个骨缺损彼此之间间隔为2 mm，自近中至远中依次编号为1, 2, 3；另一侧下颌骨相同操作制备3个骨缺损，自远中向近中编号依次为4, 5, 6，见图2A。

组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的	研究富血小板纤维蛋白与诱导骨基质联合应用对兔种植体周围骨缺损修复的效果
选择动物的条件	成年、雄性、健康的新西兰大耳白兔，体质量约3 kg
模型与所研究疾病的关系	兔种植体周围骨缺损区的骨形成及骨改建过程与人类相一致
动物来源及品系	清洁级健康新西兰大耳白兔
造模技术描述	全麻下沿兔双侧下颌骨切开皮肤，皮下组织，基层直至骨膜，用直径为5 mm的平台钻于距离下颌骨下缘上2 mm处制备直径为5 mm、深为2 mm的圆柱形骨缺损，每侧3个，双侧共6个
动物数量及分组方法	12只兔随机分为4, 8, 12周组(n=4)，每只兔6个骨缺损依次编号，置入种植体，并填入不同比例的富血小板纤维蛋白与医用诱导骨基质混合物
造模成功评价指标	大体观察，X射线片检查，苏木精-伊红染色，甲苯胺蓝酸性品红染色，荧光显微镜检查
造模后观察指标	通过大体观察，X射线片检查初步判断钛螺钉周围及骨缺损区成骨情况。荧光显微镜检查及亚甲基蓝酸性品红染色反应不同时期成骨量情况。根据苏木精-伊红染色情况计算骨形成率
造模后动物处理	3%戊巴比妥钠麻醉后空气栓塞处死
伦理委员会批准	河北医科大学第二医院科研伦理委员会批准

1.4.3 种植体的置入 裂钻于骨缺损中心处备洞，6个骨缺损区内均置入2.0 mm×7.0 mm的钛螺钉，螺钉螺帽顶部平齐正常骨面，见图2B。螺钉直立并获得良好的初期稳定性。

1.4.4 不同比例富血小板纤维蛋白及医用骨基质的填入 分别称量骨基质、富血小板纤维蛋白、富血小板纤维蛋白与骨基质2:1混合物、1:1混合物、1:2混合物，每个骨缺损区填充物总质量均为0.02 g。

1-3号骨缺损内分别填入富血小板纤维蛋白与骨基质2:1混合物、1:1混合物、1:2混合物；4号为空白对照，5号填入富血小板纤维蛋白，6号填入骨基质。将称质量后

的所有填充物分别填入骨缺损，分层对位缝合骨膜，肌层和皮肤。术后连续3 d肌注青霉素钠40 IU预防感染。

1.4.5 标本的获取 从术后4, 8, 12周组中各随机抽取1只实验动物进行荧光标记，于处死前10 d，连续3 d颈部皮下注射盐酸四环素25 mg/kg；处死前3 d，连续皮下注射钙黄绿素5 mg/kg。

分别于术后4, 8, 12周时处死各组实验动物，离体下颌骨。行X射线片检查后，标本固定、清洗、脱钙，取出螺纹钉，脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、苏木精-伊红染色；荧光标记实验标本行硬组织切片及亚甲基蓝染色。

1.5 主要观察指标 ①动物观察：观察实验动物术后进食水、活动及精神状态等一般情况；②大体观察：观察钛螺纹钉有无松动脱落，有无感染，骨缺损区的成骨情况及医用诱导骨基质吸收情况；③X射线片检查：对标本进行X射线片检查，根据密度初步判断钛螺纹钉周围及骨缺损区成骨情况；④荧光显微镜检查：根据钙黄绿素及四环素不同颜色条带的分布情况来反映骨形成初期、骨改建、骨成熟期的成骨量；⑤苏木精-伊红染色观察：行苏木精-伊红染色后显微镜下观察骨缺损区的骨质、骨量及周围纤维结缔组织情况，以钛螺纹钉上端骨缺损区×100镜下组织为单位计算骨形成率，骨形成率=新形成骨的总面积/观察区域组织总面积×100%；⑥亚甲基蓝酸性品红染色：更清晰地观察成骨细胞及成骨情况。

1.6 统计学分析 所有统计数据采用SPSS 13.0统计软件进行处理，采用多个均数比较的方差分析对不同愈合时间各个骨缺损的骨形成率进行比较， $P < 0.05$ 时为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 12只兔在观察周期内均无感染、无死亡，全部进入结果分析。术后当天无进食，精神差，较少活动；术后第1天开始少量进食，3 d后均恢复正常饮食和活动，无感染及死亡。

2.2 大体观察 兔下颌骨原手术切口愈合良好，缝线已脱落，伤口未见红肿，螺纹钉固定良好无松动和脱落，种植体周围未见骨缺损及未吸收的骨基质颗粒，部分螺纹钉表面可见不同程度的骨质覆盖及纤维结缔组织包绕。相同部位种植体表面覆盖的骨质愈合时间越长，骨质越厚。

2.3 X射线片检查结果 各组钛螺钉周围均有不同程度的高密度影，钛螺钉螺帽至螺帽均被不同程度的骨组织包绕，螺帽与螺帽之间亦存在不同程度的骨质长入。随着富血小板纤维蛋白含量升高，螺帽间骨质密度也随之升高。反之，骨质密度相对较低，部分甚至可见原骨缺损边界，螺帽与长入骨质之间存在低密度影，见图3。

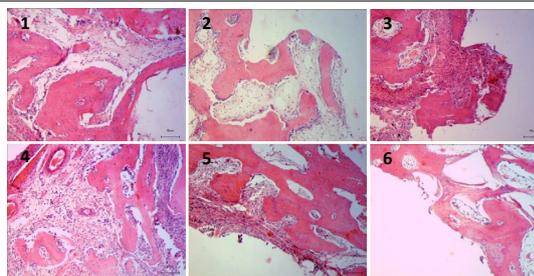
2.4 苏木精-伊红染色结果 随着富血小板纤维蛋白含量的升高，网状间质变得致密且范围明显减小，纤维结缔组织越来越少且更加致密，血管数目增多，成骨细胞增多，可见骨小梁。随着愈合时间的延长，骨小梁排列更加规则，呈岛状，继而形成板层状，可见大量骨陷窝。



图注：图 A 为富血小板纤维蛋白凝胶；B 为成膜后的富血小板纤维蛋白；C 为医用诱导骨基质

图 1 | 富血小板纤维蛋白及医用诱导骨基质的准备

Figure 1 | Preparation of platelet-rich fibrin and medical induced bone matrix



图注：沿右侧下颌骨下缘制备直径为 5 mm 深为 2 mm 的圆柱形骨缺损区共 3 个，自近中至远中依次编号为 1, 2, 3；另一侧下颌骨相同操作制备 3 个骨缺损，自远中向近中编号依次为 4, 5, 6。1-3 号骨缺损内分别填入富血小板纤维蛋白与骨基质 2 : 1 混合物、1 : 1 混合物、1 : 2 混合物；4 号为空白对照，5 号填入富血小板纤维蛋白，6 号填入骨基质

图 5 | 术后 8 周组兔种植体周围骨缺损苏木精 - 伊红染色结果 (×100)

Figure 5 | Histological observation of peri-implant bone defect in the 8-week group after operation (hematoxylin-eosin staining, ×100)

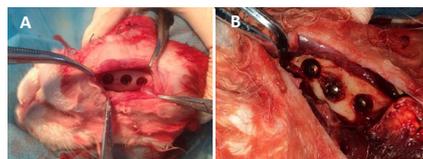
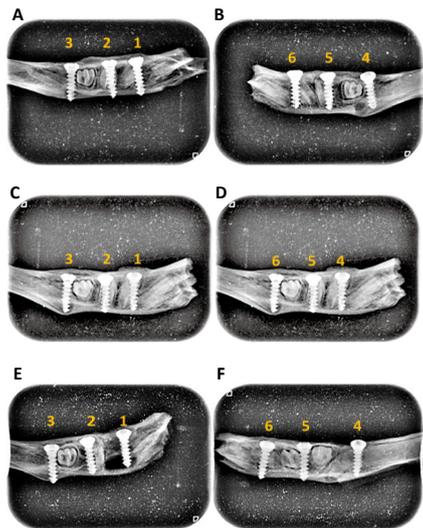


图 2 | 术中骨缺损制备 (A) 及种植体置入 (B)

Figure 2 | Intraoperative bone defect preparation (A) and implant placement (B)

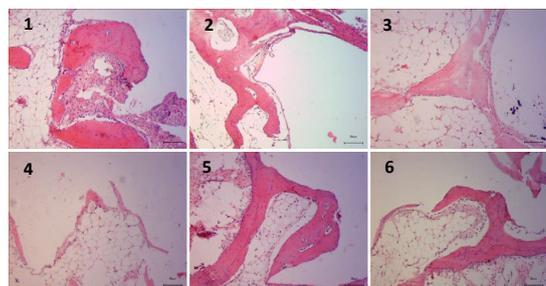


图注：图 A, B 为术后 4 周组；图 C, D 为术后 8 周组；图 E, F 为术后 12 周组。沿右侧下颌骨下缘制备直径为 5 mm 深为 2 mm 的圆柱形骨缺损区共 3 个，自近中至远中依次编号为 1, 2, 3 号；另一侧下颌骨相同操作制备 3 个骨缺损，自远中向近中编号依次为 4, 5, 6 号。1-3 号骨缺损内分别填入富血小板纤维蛋白与骨基质 2 : 1 混合物、1 : 1 混合物、1 : 2 混合物；4 号为空白对照，5 号填入富血小板纤维蛋白，6 号填入骨基质

图 3 | 各组兔种植体周围骨缺损 X 射线片结果

Figure 3 | X-ray images of peri-implant bone defects in rabbits

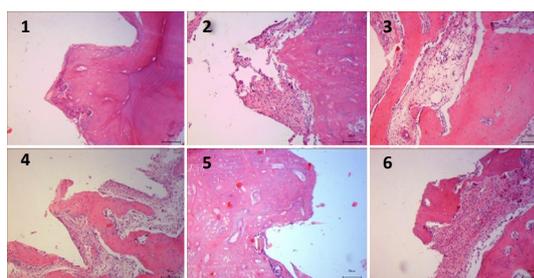
骨形成率由高到低依次为：富血小板纤维蛋白 / 骨基质 2 : 1 > 富血小板纤维蛋白 > 富血小板纤维蛋白 / 骨基质 1 : 1 > 富血小板纤维蛋白 / 骨基质 1 : 2 > 骨基质 > 空白对照，见图 4-6。



图注：沿右侧下颌骨下缘制备直径为 5 mm 深为 2 mm 的圆柱形骨缺损区共 3 个，自近中至远中依次编号为 1, 2, 3；另一侧下颌骨相同操作制备 3 个骨缺损，自远中向近中编号依次为 4, 5, 6。1-3 号骨缺损内分别填入富血小板纤维蛋白与骨基质 2 : 1 混合物、1 : 1 混合物、1 : 2 混合物；4 号为空白对照，5 号填入富血小板纤维蛋白，6 号填入骨基质

图 4 | 术后 4 周组兔种植体周围骨缺损苏木精 - 伊红染色结果 (×100)

Figure 4 | Histological observation of peri-implant bone defect in the 4-week group after operation (hematoxylin-eosin staining, ×100)



图注：沿右侧下颌骨下缘制备直径为 5 mm 深为 2 mm 的圆柱形骨缺损区共 3 个，自近中至远中依次编号为 1, 2, 3；另一侧下颌骨相同操作制备 3 个骨缺损，自远中向近中编号依次为 4, 5, 6。1-3 号骨缺损内分别填入富血小板纤维蛋白与骨基质 2 : 1 混合物、1 : 1 混合物、1 : 2 混合物；4 号为空白对照，5 号填入富血小板纤维蛋白，6 号填入骨基质

图 6 | 术后 12 周组兔种植体周围骨缺损苏木精 - 伊红染色结果 (×100)

Figure 6 | Histological observation of peri-implant bone defect in the 12-week group after operation (hematoxylin-eosin staining, ×100)

2.5 骨形成率分析结果 分别对术后 4, 8, 12 周组骨形成率进行统计分析，统计结果显示不同时间组各个骨缺损之间骨形成率差异均显著性意义 ($P < 0.05$)，且骨形成率由高到低依次为：1 号 (富血小板纤维蛋白 / 骨基质为 2 : 1) > 5 号 (富血小板纤维蛋白) > 2 号 (富血小板纤维蛋白 / 骨基质为 1 : 1) > 3 号 (富血小板纤维蛋白 / 骨基质为 1 : 2) > 6 号 (骨基质) > 4 号 (空白对照)，见表 1。

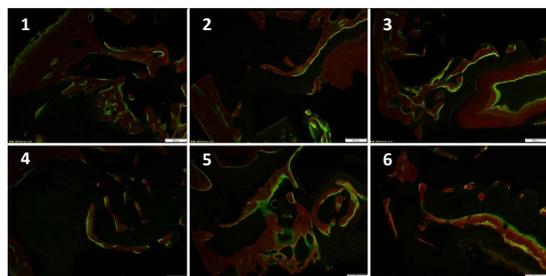
表 1 | 术后 4, 8, 12 周兔种植体周围骨缺损骨形成率的比较 ($\bar{x} \pm s, n=4, \%$)

Table 1 | Statistical analysis of bone formation rate in rabbits at 4, 8, and 12 weeks after operation

缺损	术后 4 周	术后 8 周	术后 12 周
1 号	58.12±2.82	72.78±2.14	83.87±2.43
2 号	44.72±0.72 ^a	48.74±2.18 ^a	54.48±4.31 ^a
3 号	40.34±0.76 ^{ab}	43.89±1.53 ^{ab}	49.06±2.90 ^{ab}
4 号	23.53±3.02 ^{abc}	35.03±1.08 ^{abc}	38.48±3.20 ^{abc}
5 号	50.36±1.87 ^{abcd}	63.22±2.43 ^{abcd}	73.03±2.19 ^{abcd}
6 号	35.74±3.74 ^{abcde}	38.89±0.70 ^{abcde}	43.93±0.68 ^{abcde}

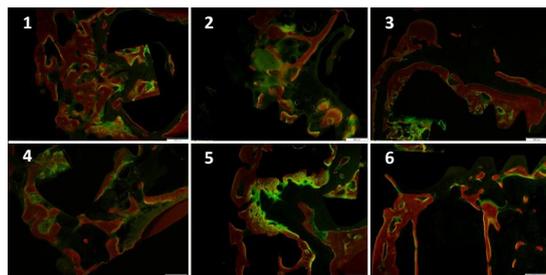
表注：1-3 号骨缺损内分别填入富血小板纤维蛋白与骨基质 2 : 1 混合物、1 : 1 混合物、1 : 2 混合物；4 号为空白对照，5 号填入富血小板纤维蛋白，6 号填入骨基质。与 1 号比较，^a $P < 0.05$ ；与 2 号比较，^b $P < 0.05$ ；与 3 号比较，^c $P < 0.05$ ；与 4 号比较，^d $P < 0.05$ ；与 5 号比较，^e $P < 0.05$

2.6 荧光标记结果 钙黄绿素是新骨形成处的绿色荧光条带，代表骨代谢与增生旺盛，四环素为土黄色条带位于新生骨的内侧，主要代表骨改建和骨成熟。富血小板纤维蛋白与骨基质 2 : 1 混合的骨缺损区条带最为广泛，富血小板纤维蛋白次之，剩余骨缺损区随着富血小板纤维蛋白的减少条带越窄，空白对照组范围最小，见图 7-9。



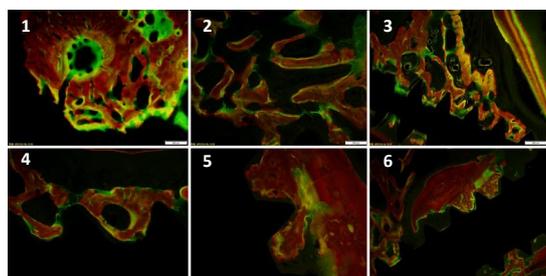
图注：沿右侧下颌骨下缘制备直径为 5 mm 深为 2 mm 的圆柱形骨缺损区共 3 个，自近中至远中依次编号为 1, 2, 3 号；另一侧下颌骨相同操作制备 3 个骨缺损，自远中向近中编号依次为 4, 5, 6 号。1-3 号骨缺损内分别填入富血小板纤维蛋白与骨基质 2 : 1 混合物、1 : 1 混合物、1 : 2 混合物；4 号为空白对照，5 号填入富血小板纤维蛋白，6 号填入骨基质

Figure 7 | Fluorescence microscopic view of peri-implant bone defects at 4 weeks after operation (×40)



图注：沿右侧下颌骨下缘制备直径为 5 mm 深为 2 mm 的圆柱形骨缺损区共 3 个，自近中至远中依次编号为 1, 2, 3 号；另一侧下颌骨相同操作制备 3 个骨缺损，自远中向近中编号依次为 4, 5, 6 号。1-3 号骨缺损内分别填入富血小板纤维蛋白与骨基质 2 : 1 混合物、1 : 1 混合物、1 : 2 混合物；4 号为空白对照，5 号填入富血小板纤维蛋白，6 号填入骨基质

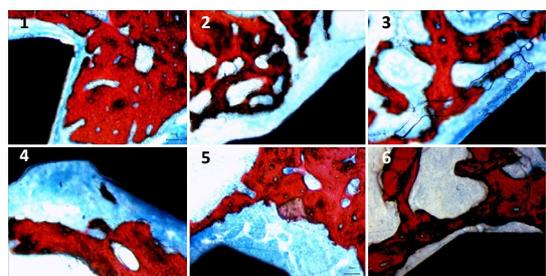
Figure 8 | Fluorescence microscopic view of peri-implant bone defects at 8 weeks after operation (×40)



图注：沿右侧下颌骨下缘制备直径为 5 mm 深为 2 mm 的圆柱形骨缺损区共 3 个，自近中至远中依次编号为 1, 2, 3 号；另一侧下颌骨相同操作制备 3 个骨缺损，自远中向近中编号依次为 4, 5, 6 号。1-3 号骨缺损内分别填入富血小板纤维蛋白与骨基质 2 : 1 混合物、1 : 1 混合物、1 : 2 混合物；4 号为空白对照，5 号填入富血小板纤维蛋白，6 号填入骨基质

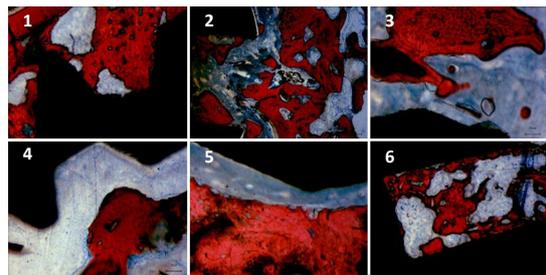
Figure 9 | Fluorescence microscopic view of peri-implant bone defects at 12 weeks after operation (×40)

2.7 甲苯胺蓝酸性品红染色结果 黑色为种植体，红色为新生骨组织。术后 4 周组可见骨小梁，骨组织与种植体间夹杂较多的纤维组织，未置填充物的骨缺损区仅见少量骨小梁，种植体被大量纤维组织环抱；随着愈合时间的延长，相对应骨缺损区骨组织有所增多，骨小梁增粗并逐渐融合成片状，见图 10-12。



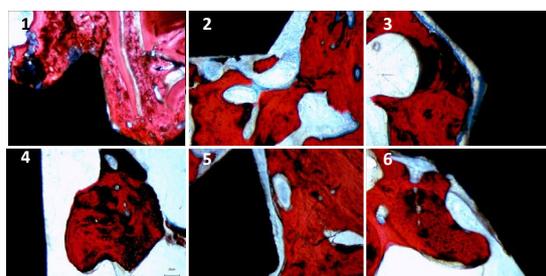
图注：沿右侧下颌骨下缘制备直径为 5 mm 深为 2 mm 的圆柱形骨缺损区共 3 个，自近中至远中依次编号为 1, 2, 3 号；另一侧下颌骨相同操作制备 3 个骨缺损，自远中向近中编号依次为 4, 5, 6 号。1-3 号骨缺损内分别填入富血小板纤维蛋白与骨基质 2 : 1 混合物、1 : 1 混合物、1 : 2 混合物；4 号为空白对照，5 号填入富血小板纤维蛋白，6 号填入骨基质

Figure 10 | Histological observation of peri-implant bone defects at 4 weeks after operation (methylene blue/acid fuchsin staining, ×40)



图注：沿右侧下颌骨下缘制备直径为 5 mm 深为 2 mm 的圆柱形骨缺损区共 3 个，自近中至远中依次编号为 1, 2, 3 号；另一侧下颌骨相同操作制备 3 个骨缺损，自远中向近中编号依次为 4, 5, 6 号。1-3 号骨缺损内分别填入富血小板纤维蛋白与骨基质 2 : 1 混合物、1 : 1 混合物、1 : 2 混合物；4 号为空白对照，5 号填入富血小板纤维蛋白，6 号填入骨基质

Figure 11 | Histological observation of peri-implant bone defects at 8 weeks after operation (methylene blue/acid fuchsin staining, ×40)



图注：沿右侧下颌骨下缘制备直径为 5 mm 深为 2 mm 的圆柱形骨缺损区共 3 个，自近中至远中依次编号为 1, 2, 3 号；另一侧下颌骨相同操作制备 3 个骨缺损，自远中向近中编号依次为 4, 5, 6 号。1-3 号骨缺损内分别填入富血小板纤维蛋白与骨基质 2 : 1 混合物、1 : 1 混合物、1 : 2 混合物；4 号为空白对照，5 号填入富血小板纤维蛋白，6 号填入骨基质

Figure 12 | Histological observation of peri-implant bone defects at 12 weeks after operation (methylene blue/acid fuchsin staining, ×40)

2.8 种植体与宿主的生物相容性 所有动物均未发生种植体相关的免疫及排斥反应。

3 讨论 Discussion

种植体周骨缺损是临床经常遇到的问题,会导致种植体暴露、松动甚至脱落。在各种骨缺损修复材料中,富血小板纤维蛋白一直是近年来关注热点,富血小板纤维蛋白的使用是一种简单、低成本、低资源的技术,可改善愈合期,促进骨组织的再生和成熟,从而缩短种植体的骨结合时间^[12]。富血小板纤维蛋白是在离心过程中发生自然而缓慢的聚合,形成较为稳定的三维立体纤维蛋白网络,是生物活性分子的储存库,有助于伤口愈合和骨再生^[13-14]。富血小板纤维蛋白不但能缓慢释放生长因子,同时纤维结构可为细胞迁移提供支持^[15],富血小板纤维蛋白中含有大量的生长因子,包括转化生长因子 $\beta 1$ 、血小板衍生生长因子、血管内皮生长因子、表皮生长因子及胰岛素样生长因子 I 等,这些生长因子在 7-28 d 之内缓慢释放,在成骨细胞增殖、骨基质形成和矿化中均发挥着重要作用,对组织愈合、骨和软组织的再生具有调节作用^[16-19];此外,富血小板纤维蛋白的纤维蛋白为疏松多孔网状结构,其支持作用无疑是富血小板纤维蛋白发挥治疗潜力的决定性因素^[20];这些特性和优势使富血小板纤维蛋白成为一种很有前途的生物材料,供临床医生和不同领域的口腔颌面外科医生使用。富血小板纤维蛋白最广泛的应用是替代骨移植材料或屏障膜来处理拔牙后的拔牙窝,此外也单独或联合骨移植材料用于上颌窦提升,其除了在硬组织再生中的重要作用外在软组织再生中也有巨大潜能,例如在软组织根面覆盖、牙周组织再生及种植体周软组织再生中的应用。富血小板纤维蛋白在全口牙弓即刻种植、即刻负荷中的应用,可促进伤口愈合及移植物的稳定,得到良好的修复效果。除了口腔领域,富血小板纤维蛋白在面部整形美容中也得到了应用,例如鼻唇沟年轻化、唇部丰满术、联合聚对二氧环己酮线改善面颊及颈部皮肤的下垂等,其容易重塑形成膜,作为基质,加速创面愈合,促进新骨形成,减少移植材料的愈合时间^[21]。

但是不可否认的是,富血小板纤维蛋白也存在一定不足,其膜的刚性较差,不足以支撑骨缺损空间,且降解相对较快,临床多与自体骨或骨替代材料联合应用。自体骨被认为是大规模重建手术的金标准,但它们可能不能完全满足缺损部位大小、形状、几何形态的需求。骨组织工程学已经提供了生物相容性材料,这些材料可用作支架或用于操纵骨形成细胞的功能或将新骨引导成所需的形状^[22-24]。富血小板纤维蛋白与骨移植植物混合可促进全骨血管生成、干细胞迁移和成骨分化,有利于骨移植植物的整合^[25-26]。此次研究应用自体富血小板纤维蛋白凝集物与异体骨替代材料的混合物,用于种植体周骨缺损的修复,观察骨再生的效果。此次研究中骨形成率由高到低依次为富血小板纤维蛋白/骨基质 2 : 1> 富血小板纤维蛋白>富血小板纤维蛋白/骨基质 1 : 1> 富血

小板纤维蛋白/骨基质 1 : 2> 骨基质>空白对照,表明富血小板纤维蛋白能够促进种植体周围骨缺损的骨生成,同时验证了富血小板纤维蛋白促进成骨的作用以及减少感染的作用。但是,并非所有的实验均证实富血小板纤维蛋白对于组织愈合是有效的。此次实验设计的富血小板纤维蛋白分组以及样本数量有限,不能完全确定富血小板纤维蛋白有无剂量依赖性,没有证实其浓度是否与成骨效果完全呈正相关,关于富血小板纤维蛋白在成骨过程中具体的作用机制以及释放的生长因子之间有无拮抗关系等,仍需进一步的实验研究来证实。此外富血小板纤维蛋白的准备过程及离心过程也存在争议,例如不同的实验动物是否会影响到其质与量,不同的学者对于离心的速度与时间有不同的观点,因此,一些作者建议在今后的研究中使用必要的离心参数^[27]。在临床实践中,富血小板纤维蛋白的特点可能受患者的年龄、全身性疾病(如血小板减少症、出血性疾病、糖尿病)、营养状况、环境或种族差异、自身免疫、遗传易感性等因素影响^[28-29]。例如 YAJAMANYA 等^[29-30]发现,富血小板纤维蛋白中的纤维蛋白随着年龄的变化而变化,密度减小,变得疏松,血小板和白细胞的数量也减少。浓缩生长因子作为第 3 代血小板浓缩制品,在特定离心机中制备完成,是变速离心的产物,离心转速为 2 400-2 700 r/s,这是为了分离静脉血中的细胞,因此浓缩生长因子中富含纤维蛋白凝块比富血小板纤维蛋白中的大得多,而且更黏稠,纤维蛋白的含量也更多。使用富含纤维蛋白凝块时,将显示更强的再生力和更好的多样性^[31],与富血小板纤维蛋白相比具有更高的抗张强度、更多的生长因子、更好的黏性和更高的黏合强度^[32]。浓缩生长因子的诸多优势为以后的研究提供了方向。

致谢:感谢河北医科大学第二医院实验动物中心提供的实验动物;感谢河北医科大学第二医院口腔颌面外科实验室提供的实验平台。

作者贡献:赵云转负责实验设计,高玺鑫、王溪负责实验实施,范成辉、崔怡负责数据收集及整理,杨威负责实验评估,赵云转、高玺鑫负责成文,赵云转负责审核。

经费支持:该文章接受了“2015 年省直(河北)医疗机构老年病防治科研项目及河北省医学科学研究课题计划(20210662)”的基金资助。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,不存在利益冲突。

机构伦理问题:实验方案经河北医科大学第二医院科研伦理委员会批准,批准号为 2021-AE020。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赵云转副教授审核。

文章版权:文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

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。

4 参考文献 References

- [1] 刘宝林, 林野, 李德华. 口腔种植学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [2] BORIE E, OLIVÍ DG, ORSI IA, et al. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(5):7922-7929.
- [3] CHOUKROUN J, ADDA F, SCHOEFLER C, et al. Une opportunité en paro-implantologie: Le PRF. *Implantodontie*. 2000;42:55-62.
- [4] VIDHALE G, JAIN D, JAIN S, et al. Management of Radicular Cyst Using Platelet-Rich Fibrin & Iliac Bone Graft- A Case Report. *Clin Diagn Res*. 2015;9(6):ZD34-ZD36.
- [5] BANSAL C, BHARTI V. Evaluation of efficacy of autologous platelet-rich fibrin with demineralized-freeze dried bone allograft in the treatment of periodontal intrabony defects. *J Indian Soc Periodontol*. 2013;17(3):361-366.
- [6] RIEDEL K, RIEDEL F, GOESSLER UR, et al. Current status of genetic modulation of growth factors in wound repair. *Int J Mol Med*. 2006;17(2):183-193.
- [7] LI Q, PAN S, DANGARIA SJ, et al. Platelet-Rich Fibrin Promotes Periodontal Regeneration and Enhances Alveolar Bone Augmentation. *Biomed Res Int*. 2013;2013:638043.
- [8] DOHAN EHRENFEST DM, DISS A, ODIN G, et al. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(3):341-352.
- [9] LI Q, GENG Y, LU L. Platelet-rich fibrin-induced bone marrow mesenchymal stem cell differentiation into osteoblast-like cells and neural cells. *Neural Regen Res*. 2011;6(31):2419-2423.
- [10] 常晓峰, 杜良智, 刘少丽. 上颌窦底提升及人工骨粉植入的动物实验研究 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2010, 26(4):441-444.
- [11] 高飞, 衡立君, 贾栋. 神经内镜下经鼻蝶垂体腺瘤切除术中鞍底重建 [J]. *中国临床神经外科杂志*, 2014, 19(7):403-405.
- [12] ORTEGA-MEJIA H, ESTRUGO-DEVESA A, SAKA-HERRÁN C, et al. Platelet-Rich Plasma in Maxillary Sinus Augmentation: Systematic Review. *Materials*. 2020;13:622.
- [13] JAYALAKSHMI KB, AGARWAL S, SINGH MP, et al. Platelet-Rich Fibrin with β -Tricalcium Phosphate—A Novel Approach for Bone Augmentation in Chronic Periapical Lesion: A Case Report. *Case Rep Dent*. 2012;2012:902858.
- [14] NASIRZADE J, KARGARPOUR Z, HASANNIA S, et al. Platelet-rich fibrin elicits an anti-inflammatory response in macrophages in vitro. *J Periodontol*. 2020;91:244-252.
- [15] 郭洪亮, 郑纪伟, 韩建国. 转化生长因子 β 1 对种植体表面成骨细胞 I 型胶原蛋白基因表达研究 [J]. *交通医学*, 2013, 27(5):449-453.
- [16] 杨安全, 何家才. 富血小板纤维蛋白在口腔种植中应用的研究进展 [J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(10):1066-1067.
- [17] LYNCH SE, BUSER D, HERNANDEZ RA, et al. Effects of the platelet-derived growth factor insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol*. 1991;62(11):710-716.
- [18] 胡雅丽, 焦艳军, 高莺. 罗格列酮对 2 型糖尿病大鼠种植体周围血小板衍生生长因子-B 影响的实验研究 [J]. *中国口腔种植学杂志*, 2013, 18(3):125-128.
- [19] 郭玲, 王敏, 郝亮. 胰岛素样生长因子 1 对小鼠成骨细胞增殖和碱性磷酸酶活性的影响 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(33):6095-6098.
- [20] SHAH M, PATEL J, DAVE D, et al. Comparative evaluation of platelet-rich fibrin with demineralized freeze-dried bone allograft in periodontal infrabony defects: A randomized controlled clinical study. *J Indian Soc Periodontol*. 2015;19(1):56-60.
- [21] LIU R, YAN M, CHEN S, et al. Effectiveness of Platelet-Rich Fibrin as an Adjunctive Material to Bone Graft in Maxillary Sinus Augmentation: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Biomed Res Int*. 2019;2019:7267062.
- [22] PANG L, HAO W, JIANG M, et al. Bony defect repair in rabbit using hybrid rapid prototyping polylactic-co-glycolic acid/ β -tricalcium phosphate collagen I/apatite scaffold and bone marrow mesenchymal stem cells. *Indian J Orthop*. 2013;47(4):388-394.
- [23] JAMES R, LAURENCIN CT. Regenerative engineering and advanced materials science. *MRS Bulletin*. 2017;42(8):600-607.
- [24] ANBU RT, SURESH V, GOUNDER R, et al. Comparison of the Efficacy of Three Different Bone Regeneration Materials: An Animal Study. *Eur J Dent*. 2019;13:22-28.
- [25] MOURÃO CF, VALIENSE H, MELO ER, et al. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Rev Col Bras Cir*. 2015;42(6):421-423.
- [26] AMARAL VALLADÃO CA JR, FREITAS MONTEIRO M, JOLY JC. Guided bone regeneration in staged vertical and horizontal bone augmentation using platelet-rich fibrin associated with bone grafts: a retrospective clinical study. *Int J Implant Dent*. 2020;6(1):72.
- [27] MIRON RJ, PINTO NR, QUIRYNEN M, et al. Standardization of relative centrifugal forces in studies related to platelet-rich fibrin. *J Periodontol*. 2019;90(8):817-820.
- [28] ARUNACHALAM M, PULIKKOTIL SJ, SONIA N. Platelet rich fibrin in periodontal regeneration. *Open Dent J*. 2016;10:174-181.
- [29] YAJAMANYA SR, CHATTERJEE A, BABU CN, et al. Fibrin network pattern changes of platelet-rich fibrin in young versus old age group of individuals: a cell block cytology study. *J Indian Soc Periodontol*. 2016;20(2):151-156.
- [30] LIU Y, SUN X, YU J, et al. Platelet-Rich Fibrin as a Bone Graft Material in Oral and Maxillofacial Bone Regeneration: Classification and Summary for Better Application. *Biomed Res Int*. 2019;2019:3295756.
- [31] SINGH S, SINGH A, SINGH S, et al. Application of PRF in surgical management of periapical lesions. *Natl J Maxillofac Surg*. 2013;4(1):94-99.
- [32] 李超, 王天祥, 邹高峰. CGF 技术在口腔种植中的应用 [J]. *中外健康文摘*, 2012, 9(17):446-447.

(责任编辑: GD, ZN, SX)