

负载血小板衍生生长因子 BB 的壳聚糖 / 还原氧化石墨烯支架修复牙槽骨缺损

白相宇¹, 霍峰¹, 郝妍¹, 王泽成², 郭晓宇³<https://doi.org/10.12307/2026.514>

投稿日期: 2024-10-21

采用日期: 2024-11-30

修回日期: 2025-02-28

在线日期: 2025-03-18

中图分类号:

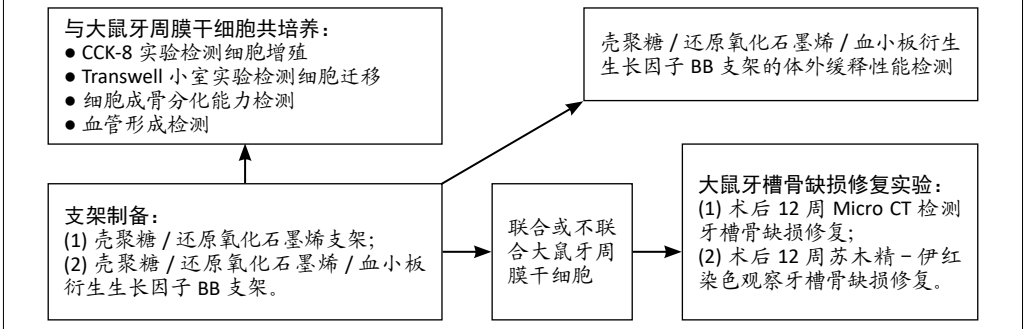
R459.9; R318.08; R782.1

文章编号:

2095-4344(2026)02-00329-09

文献标识码: A

文章快速阅读: 壳聚糖 / 还原氧化石墨烯 / 血小板衍生生长因子 BB 支架修复牙槽骨缺损



文题释义:

血小板衍生生长因子: 在器官胚胎发生与发育、创伤愈合过程中发挥着重要作用, 是成骨细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞和神经胶质细胞等分裂增殖时的重要促细胞分裂原。研究显示血小板衍生生长因子BB可刺激间充质干细胞的增殖与成骨分化, 加快成骨样细胞的钙化进程; 可促进成骨细胞的迁移, 促进新骨形成; 可促进人牙槽骨缺损修复及牙周软组织再生; 此外, 血小板衍生生长因子BB还具有趋化活性与促血管生成活性, 可发挥促骨损伤修复作用。

还原氧化石墨烯: 在氧化石墨烯表面生成氧官能团的情况下, 可以采用还原剂将氧化物还原为羟基或醇基, 从而得到还原氧化石墨烯。还原氧化石墨烯在导电性和机械强度方面比氧化石墨烯有更好的性能。

摘要

背景: 研究显示血小板衍生生长因子BB可刺激间充质干细胞的增殖与成骨分化, 加快成骨样细胞的钙化进程, 但其临床应用存在半衰期短、易分解等问题, 将生长因子负载到适宜的生物材料支架上可使其缓慢持续释放, 维持有效的作用浓度, 成为目前研究的热点话题。

目的: 利用壳聚糖/还原氧化石墨烯支架负载血小板衍生生长因子BB, 观察该支架修复大鼠牙槽骨缺损的作用。

方法: ①分别制备壳聚糖/还原氧化石墨烯支架(记为CS/rGO支架)与负载不同质量浓度(5, 10, 15, 20 mg/L)血小板衍生生长因子BB的壳聚糖/还原氧化石墨烯支架(分别记为CS/rGO/PDGF-BB-5、CS/rGO/PDGF-BB-10、CS/rGO/PDGF-BB-15、CS/rGO/PDGF-BB-20支架)。将5组支架分别与大鼠牙周膜干细胞共培养, 通过CCK-8实验与Transwell小室实验分别检测细胞增殖与迁移情况, 筛选适宜的生长因子负载质量浓度进行后续实验。将CS/rGO支架(或浸提液)、CS/rGO/PDGF-BB-15支架(或浸提液)分别与大鼠牙周膜干细胞共培养, 检测细胞成骨分化与成血管能力。②在16只SD大鼠双侧上颌第一磨牙前制备牙槽骨缺损模型, 随机分4组干预: 空白对照组不进行任何干预, 单纯支架组植入CS/rGO/PDGF-BB-15支架, 对照组植入CS/rGO支架与大鼠牙周膜干细胞复合物, 实验组植入CS/rGO/PDGF-BB-15支架与大鼠牙周膜干细胞复合物, 每组4只。术后12周, 通过Micro CT扫描与苏木精-伊红染色观察牙槽骨缺损修复情况。

结果与结论: ①CS/rGO/PDGF-BB-5、CS/rGO/PDGF-BB-10、CS/rGO/PDGF-BB-15、CS/rGO/PDGF-BB-20支架均可促进大鼠牙周膜干细胞的增殖与迁移, 其中CS/rGO/PDGF-BB-15支架促细胞增殖与迁移作用最显著, 使用该支架进行后续实验。与CS/rGO支架比较, CS/rGO/PDGF-BB-15支架可促进大鼠牙周膜干细胞的成骨与成血管分化。②Micro CT扫描与苏木精-伊红染色结果显示, 实验组牙槽骨缺损修复效果最好, 可见大量新生骨组织与血管形成。③负载血小板衍生生长因子BB的壳聚糖/还原氧化石墨烯支架可通过促进大鼠牙周膜干细胞的增殖、迁移、成血管与成骨分化, 进而有效促进大鼠牙槽骨缺损的修复。

关键词: 牙槽骨缺损; 支架; 壳聚糖; 还原氧化石墨烯; 血小板衍生生长因子BB; 工程化口腔材料

Platelet-derived growth factor BB-loaded chitosan/reduced graphene oxide scaffold for repairing alveolar bone defects

Bai Xiangyu¹, Huo Feng¹, Hao Yan¹, Wang Zecheng², Guo Xiaoyu³

¹Department of Stomatology, ²Office of Resident Training, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; ³Department of Stomatology, Weichang Manchu and Mongolian Autonomous County Hospital, Chengde 067000, Hebei Province, China

Bai Xiangyu, MS, Attending physician, Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

Corresponding author: Huo Feng, MS, Chief physician, Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

承德医学院附属医院, ¹口腔科, ³住培办公室, 河北省承德市 067000; ²围场满族蒙古族自治县医院口腔科, 河北省承德市 067000

第一作者: 白相宇, 男, 1989年生, 河北省承德市人, 满族, 硕士, 主治医师, 主要从事牙周病研究。

通讯作者: 霍峰, 硕士, 主任医师, 承德医学院附属医院口腔科, 河北省承德市 067000

<https://orcid.org/0009-0008-9065-939X> (白相宇)

基金资助: 河北省承德市科技支撑项目 (202401A005), 项目负责人: 白相宇

引用本文: 白相宇, 霍峰, 郝妍, 王泽成, 郭晓宇. 负载血小板衍生生长因子BB的壳聚糖/还原氧化石墨烯支架修复牙槽骨缺损[J].

中国组织工程研究, 2026, 30(2):329-337.



Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that platelet-derived growth factor BB can stimulate the proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and accelerate the calcification process of osteoblast-like cells. However, its clinical application has problems such as short half-life and easy decomposition. Loading the growth factor onto a suitable biomaterial scaffold can enable its slow and continuous release and maintain an effective concentration, which has become a hot topic in current research.

OBJECTIVE: To observe the effect of chitosan/reduced graphene oxide scaffolds loaded with platelet-derived growth factor BB on the repair of alveolar bone defect in rats.

METHODS: (1) Chitosan/reduced graphene oxide scaffolds (referred to as CS/rGO scaffolds) and chitosan/reduced graphene oxide scaffolds loaded with different mass concentrations (5, 10, 15, and 20 mg/L) of platelet-derived growth factor BB (referred to as CS/rGO/PDGF-BB-5, CS/rGO/PDGF-BB-10, CS/rGO/PDGF-BB-15, and CS/rGO/PDGF-BB-20 scaffolds) were prepared respectively. The five groups of scaffolds were co-cultured with rat periodontal ligament stem cells. The cell proliferation and migration were detected by CCK-8 assay and Transwell chamber assay, respectively, to screen the appropriate growth factor loading mass concentration for subsequent experiments. CS/rGO scaffolds (or extracts) and CS/rGO/PDGF-BB-15 scaffolds (or extracts) were co-cultured with rat periodontal ligament stem cells, and the osteogenic differentiation and angiogenic ability of the cells were detected. (2) The alveolar bone defect model was prepared in front of the bilateral maxillary first molars of 16 SD rats, and the rats were randomly divided into 4 intervention groups: the blank control group did not receive any intervention, the simple scaffold group was implanted with CS/rGO/PDGF-BB-15 scaffold, the control group was implanted with CS/rGO scaffold and rat periodontal ligament stem cell complex, and the experimental group was implanted with CS/rGO/PDGF-BB-15 scaffold and rat periodontal ligament stem cell complex, with 4 rats in each group. Twelve weeks after surgery, the bone repair of the alveolar bone defect was observed by Micro CT scanning and hematoxylin-eosin staining.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) CS/rGO/PDGF-BB-5, CS/rGO/PDGF-BB-10, CS/rGO/PDGF-BB-15, and CS/rGO/PDGF-BB-20 scaffolds could promote the proliferation and migration of rat periodontal ligament stem cells. Among them, the CS/rGO/PDGF-BB-15 scaffold had the most significant effect on promoting cell proliferation and migration, and this scaffold was used for subsequent experiments. Compared with the CS/rGO scaffold, the CS/rGO/PDGF-BB-15 scaffold could promote the osteogenic and angiogenic differentiation of rat periodontal ligament stem cells. (2) Micro CT scanning and hematoxylin-eosin staining results showed that the experimental group had the best alveolar bone defect repair effect, and a large amount of new bone tissue and blood vessel formation could be seen. (3) The chitosan/reduced graphene oxide scaffold loaded with platelet-derived growth factor BB can effectively promote the repair of rat alveolar bone defects by promoting the proliferation, migration, angiogenic and osteogenic differentiation of rat periodontal ligament stem cells.

Key words: alveolar bone defect; scaffold; chitosan; reduced graphene oxide; platelet-derived growth factor BB; engineered dental material

Funding: Hebei Province Chengde City Science and Technology Support Project, No. 202401A005 (to BXY)

How to cite this article: BAI XY, HUO F, HAO Y, WANG ZC, GUO XY. Platelet-derived growth factor BB-loaded chitosan/reduced graphene oxide scaffold for repairing alveolar bone defects. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2026;30(2):329-337.

0 引言 Introduction

由创伤、炎症、牙周疾病或先天性骨开窗等原因造成的牙槽骨缺损是临床常见病，长期的牙槽骨缺损将导致牙齿松动、脱落甚至对颜面部美观造成影响^[1]。目前主要通过自体骨移植、异体与异种骨移植与人工合成材料修复骨缺损^[2]，但是上述方法存在自体骨量不足、异体骨移植后免疫排斥反应、异体骨移植伦理限制等问题^[3]。因此，制备合适的人工合成材料一直是该领域的研究热点。近年来骨组织工程技术迅速发展，为骨缺损修复提供了新的思路与选择。

骨组织工程包括种子细胞、生物活性分子与生物材料支架三大要素^[4]。生物材料支架需具有良好的生物相容性、降解性、机械强度等，可为种子细胞的生长提供三维结构空间，为血管的长入提供有利条件^[4-5]。壳聚糖作为天然高分子材料具有良好的降解性、生物相容性、生物活性及安全性，但壳聚糖作为支架存在机械性能不足、降解速率过快等问题^[6-7]。还原氧化石墨烯作为石墨烯的衍生物之一，是将氧化石墨烯通过还原反应获得，具有较高的比表面积、机械性能与导电率等，并且较氧化石墨烯具有更好的生物安全性与稳定性，已被广泛应用于细胞培养、生物传感及骨组织工程中^[8-9]。研究证实，相较于壳聚糖支架，壳聚糖/还原氧化石墨烯支架具有良好的吸水率、降解速率与机械性能，能促进人牙髓干细胞的增殖与黏附，可作为骨组织工程支架^[10-11]。牙周膜干细胞是从牙周膜中分离出来的一类干细胞，可分化为成骨细胞、成纤维细胞、成牙骨质细胞，形成牙槽骨、牙周纤维

及牙骨质结构^[12]，可作为牙槽骨缺损修复的种子细胞。

血小板衍生生长因子在器官胚胎发生与发育、创伤愈合过程中发挥着重要作用，是成骨细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞和神经胶质细胞等分裂增殖时的重要促细胞分裂原^[13]。研究显示，血小板衍生生长因子 BB 可刺激间充质干细胞的增殖与成骨分化，加快成骨样细胞的钙化进程^[14-15]；可促进成骨细胞的迁移，促进新骨形成^[16]；可促进人牙槽骨缺损修复及牙周软组织再生^[17]；此外，血小板衍生生长因子 BB 还具有趋化活性与促血管生成活性^[18]，发挥促骨损伤修复作用。

基于以上研究背景，此次实验利用壳聚糖/还原氧化石墨烯支架负载血小板衍生生长因子 BB，观察该支架对大鼠牙周膜干细胞增殖、迁移及成骨、成血管分化的作用，以及在大鼠牙槽骨缺损修复中的作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞实验与动物实验，组间比较进行单因素方差分析及事后 Turkey 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 11 月至 2024 年 10 月在承德医学院附属医院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞、试剂与仪器 天然石墨粉 (纯度 > 99.98%，泰州巨纳新能源有限公司)，壳聚糖 (脱乙酰度 95%，上海吉至生化科技有限公司)，血小板衍生生长因子 BB (上海联迈

生物工程有限公司), 抗坏血酸(廊坊鹏彩精细化工有限公司), 高锰酸钾(襄阳友德仕化工有限公司), β -甘油磷酸钠(合肥博美生物科技有限责任公司), 大鼠牙周膜干细胞(上海康朗生物科技有限责任公司), 血小板衍生生长因子 BB ELISA 检测试剂盒(武汉赛培生物科技有限责任公司), CCK-8 试剂、胎牛血清、DMEM 培养基(北京麦格生物医学有限公司), 碱性磷酸酶染色试剂盒、碱性磷酸酶定量试剂盒(西安齐岳生物科技有限公司), 茜素红(湖北兴恒业科技有限公司), 苏木精-伊红染色试剂盒(西安齐岳生物科技有限公司), 磁力搅拌器(杭州秋籁科技有限公司), 倒置显微镜(4XCE, 济宁市鑫兖矿山机械设备有限公司), 真空冷冻干燥机(北京亚星仪科科技发展有限公司), Transwell 小室(苏州青柠生物科技有限公司), 酶标仪(HBS-1101, 南京德铁实验设备有限公司), 小动物 Micro CT 扫描仪(上海佰珅科学仪器有限公司)。

1.3.2 实验动物 雄性 SD 大鼠 16 只, 8 周龄, SPF 级, 体质量(200±15) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 使用许可证号: SYXK(京)2022-0004。动物实验已通过承德医学院附属医院伦理委员会审批(NO.CYFYLL2023714)。

1.4 实验方法

1.4.1 制备壳聚糖 / 还原氧化石墨烯支架

制备氧化石墨烯: 采用改良 Hummers 法制备氧化石墨烯^[19]。在冰浴下称量 1 g 石墨加入 25 mL 浓硫酸中混匀, 然后缓慢加入 3.5 g 高锰酸钾粉末并搅拌 2 h, 更换为 35 °C 水浴在加热状态下继续反应 1.5 h; 向混合溶液中加入 60 mL 去离子水, 将水浴装置加热至 98 °C 反应 10 min, 加入 100 mL 去离子水稀释混合溶液; 加入过量的体积分数 30% 过氧化氢溶液, 观察反应无气泡产生后静置并冷却反应液, 用 10% 稀盐酸充分洗涤并离心, 加入氯化钡溶液反应直至无沉淀产生为止; 真空冷冻干燥 24 h 得到棕黄色粉末, 溶于去离子水中超声剥离 3 h, 得到 3 mg/mL 氧化石墨烯分散液。

制备还原氧化石墨烯: 采用化学还原法制备还原氧化石墨烯^[19]。将抗坏血酸粉末加入氧化石墨烯分散液中, 其中抗坏血酸与氧化石墨烯的质量比为 10 : 1, 超声冰浴下分散 1 h, 室温下静置 48 h; 用去离子水充分洗涤反应液, 直至溶液呈中性为止, 真空冷冻干燥 48 h, 得到黑褐色絮状粉末。

制备壳聚糖 / 还原氧化石墨烯支架: 在 120 °C、0.2 MPa 高温高压下处理壳聚糖 10 min; 将 0.2 g 壳聚糖加入到 9 mL HCl(0.1 mol/L) 中, 利用磁力搅拌器搅拌 2 h, 加入 25 mg 还原氧化石墨烯粉末, 超声冰浴下分散 1 h; 将 0.56 g β -甘油磷酸钠加入 1 mL 三蒸水中, 超声冰浴下反应 15 min, 得到 β -甘油磷酸钠溶液, 逐滴加入壳聚糖 / 还原氧化石墨烯分散液中, 置于 37 °C 水浴箱内反应 10 min, 再置于 -20 °C 冰箱内

冷冻 24 h, 真空冷冻干燥 48 h, 得到壳聚糖 / 还原氧化石墨烯支架(记为 CS/rGO 支架)^[19]。

1.4.2 制备负载血小板衍生生长因子 BB 的壳聚糖 / 还原氧化石墨烯支架 在制备 CS/rGO 支架的过程中, 将不同质量的血小板衍生生长因子 BB 分别加入 β -甘油磷酸钠溶液, 使其终质量浓度分别为 5, 10, 15, 20 mg/L, 同理制备壳聚糖 / 还原氧化石墨烯 / 血小板衍生生长因子 BB 支架, 分别记为 CS/rGO/PDGF-BB-5、CS/rGO/PDGF-BB-10、CS/rGO/PDGF-BB-15、CS/rGO/PDGF-BB-20 支架。

1.4.3 大鼠牙周膜干细胞的培养 复苏冻存的大鼠牙周膜干细胞悬液(1 mL), 加入 4 mL 含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基混匀, 1 000 r/min 离心 4 min 后弃上清液, 再加入 2 mL 含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基混匀, 于培养瓶中过夜后, 观察细胞融合达到 80%-90% 后进行传代培养。取第 3-5 代大鼠牙周膜干细胞进行后续实验。

1.4.4 筛选适宜的血小板衍生生长因子 BB 负载质量浓度 通过 CCK-8 实验与 Transwell 小室实验分别检测细胞增殖与迁移情况, 筛选适宜的生长因子负载质量浓度进行后续实验。

支架对大鼠牙周膜干细胞增殖的影响: 将 5 组支架经环氧乙烷灭菌(50 °C, 1 h)后分别置于 96 孔板内, 将大鼠牙周膜干细胞悬液分别接种于 96 孔板内的各支架上, 以未加入支架单独培养的细胞悬液为对照, 细胞密度为 1×10^3 / 孔, 每组 3 复孔, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养。培养 1, 3, 5, 7 d 后, 向每孔内加入 10% CCK-8 试剂孵育 2 h, 使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值。

支架对大鼠牙周膜干细胞迁移的影响: 将大鼠牙周膜干细胞悬液分别接种于 Transwell 小室的上室中, 细胞密度为 1×10^6 / 孔, 在 Transwell 小室的下室中分别放入 CS/rGO、CS/rGO/PDGF-BB-5、CS/rGO/PDGF-BB-10、CS/rGO/PDGF-BB-15、CS/rGO/PDGF-BB-20 支架, 在下室均加入 500 μ L DMEM 培养基, 设置阴性对照(未加入支架, 仅加入 DMEM 培养基)与阳性对照组(未加入支架, 仅加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基), 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养。培养 24 h 后, 用 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min, 擦除小室上层表面未迁移的细胞, 滴加结晶紫染色液染色 5 min, 用 PBS 清洗后取下滤膜, 置于载玻片上, 显微镜下观察迁移至滤膜下表面的细胞并拍照, 随机选取 3 个视野, 利用 Image J 软件统计迁移至滤膜下表面的细胞数量。

1.4.5 检测支架的缓释性能 将 CS/rGO/PDGF-BB-15 支架置于 4 mL EP 管内, 向管内加入 3 mL PBS(pH=7.4), 置于摇床内 37 °C 下孵育, 摇床振荡速率为 80 r/min。设定不同的孵育时间点

(第1, 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42天), 吸取 PBS 置于 -20 °C 保存, 同时添加新鲜的 3 mL PBS(pH=7.4)。取冻存的 PBS 样本, 采用 ELISA 法检测血小板衍生生长因子 BB 浓度, 绘制血小板衍生生长因子 BB 缓释曲线, 计算血小板衍生生长因子 BB 累计释放率。

1.4.6 支架对大鼠牙周膜干细胞成骨分化的影响 将 CS/rGO 支架、CS/rGO/PDGF-BB-15 支架分别置于 6 孔板内, 每孔加入 DMEM 培养基, 支架表面积与 DMEM 培养体积比为 3 cm²/1 mL, 于 37 °C 下浸提 2 d, 通过细菌过滤器获得支架浸提液, 置于 4 °C 冰箱保存。

将大鼠牙周膜干细胞悬液分别接种于 24 孔板内, 细胞密度为 5×10⁴/孔, 培养 24 h 后弃原培养基, 分 3 组处理: 对照组更换为含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, CS/rGO 支架组更换为含体积分数 10% 胎牛血清的 CS/rGO 支架浸提液, CS/rGO/PDGF-BB-15 支架组更换为含体积分数 10% 胎牛血清的 CS/rGO/PDGF-BB-15 支架浸提液, 每组进行成骨诱导 (加入 50 μg/mL 抗坏血酸、10 mmol/L β-甘油磷酸和 10 nmol/L 地塞米松) 培养, 每组 3 复孔。每 3 d 更换一次培养基。成骨诱导培养 7, 14 d 进行碱性磷酸酶染色, 显微镜下观察并拍照; 进一步使用碱性磷酸酶定量试剂盒分析碱性磷酸酶活性。成骨诱导 14, 21 d 进行茜素红染色, 显微镜下观察并拍照; 进一步量化分析钙结节沉积情况, 每孔加入 100 μL 10% 氯化十六烷基吡啶孵育 1 h, 使用酶标仪在 562 nm 处检测吸光度值。

1.4.7 支架对大鼠牙周膜干细胞血管形成的影响 将 CS/rGO 支架、CS/rGO/PDGF-BB-15 支架经环氧乙烷灭菌 (50 °C, 1 h) 后分别置于 12 孔板内, 将大鼠牙周膜干细胞悬液分别接种于 12 孔板内的各支架上, 以未加入支架单独培养的细胞为对照, 细胞密度为 8×10⁴/孔, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养。

培养 4 d 后收集各组细胞, 计数细胞并稀释至 1.5×10⁸ L⁻¹。制备基质胶, 将 100 μL 各组细胞悬液缓慢接种于基质胶上, 十字摇匀, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养。培养 24 h 后, 显微镜下观察并拍照, 利用 Image J 软件统计小管节点数、小管节段数量、小管总长度与小管网格数量。

培养 4 d 后收集各组细胞, 弃培养基, 用 PBS 清洗, 加入 TRIzol 细胞裂解液冰上裂解 10 min, 提取细胞 RNA, 检测 RNA 纯度与浓度。将 RNA 反转录为 cDNA, 配置反应体系, 进行 PCR 扩增反应: 96 °C 预变性 1 min; 95 °C 10 s、60 °C 30 s、72 °C 32 s, 扩增 50 个循环。采用 qRT-PCR 检测血管内皮生长因子、干细胞因子、碱性成纤维细胞生长因子的 mRNA 表达, 以 GAPDH 为内参。引物序列见表 1。

表 1 | qRT-PCR 检测引物序列

Table 1 | Primer sequences for qRT-PCR detection

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
血管内皮生长因子	CAT GAA GGA AAA GCC AAG CAG	GGG GCC AGA CCA AAG ATA GAG
干细胞因子	GAC GTT GGT CAA CTC TGT TAA C	GTC AAG GTA CAG CAT CGA GAT A
碱性成纤维细胞生长因子	TGG TTA CTG TCA TGG CGG GTA	TCT CAG ATC GTT GAA CCT TGC TA
GAPDH	GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT	GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG

1.4.8 支架修复大鼠牙槽骨缺损实验 将第 3 代大鼠牙周膜干细胞悬液分别接种于 CS/rGO、CS/rGO/PDGF-BB-15 支架共培养, 细胞数量约 1×10⁵, 细胞培养基为体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。共培养 2 d 后用于牙槽骨缺损修复实验。

腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉 16 只 SD 大鼠, 仰卧位固定于手术台, 在双侧上颌常规备皮、消毒、铺巾, 分离上颌第一磨牙腭侧的牙龈与黏骨膜, 在第一磨牙前用球钻做一大小为 2 mm×2 mm×1 mm 的牙槽骨缺损, 随机分 4 组干预: 空白对照组 (n=4) 不进行任何治疗, 单纯支架组 (n=4) 植入 CS/rGO/PDGF-BB-15 支架, 对照组 (n=4) 植入 CS/rGO 支架与大鼠牙周膜干细胞复合物, 实验组 (n=4) 植入 CS/rGO/PDGF-BB-15 支架与大鼠牙周膜干细胞复合物, 逐层缝合。术后连续 3 d 肌注青霉素钠 4×10⁴ U。

Micro CT 扫描: 术后 12 周, 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉大鼠, 使用 Micro CT 扫描 SD 大鼠上颌骨 (80 kV, 100 μA, 单次曝光时间 50 ms, 扫描分辨率 25 μm, 扫描角度间隔 0.5°) 并利用重建和分析软件 Hiscan Analyzer software 进行数据采集与分析。

苏木精 - 伊红染色: Micro CT 扫描后于麻醉状态下处死大鼠, 收集上颌骨置于 10%EDTA(pH=7.4) 中 37 °C 振荡 3 个月以脱钙。常规脱水石蜡包埋后, 在缺损处做连续切片 (5 μm 厚), 按苏木精 - 伊红染色试剂盒说明书染色以检测缺损处骨组织再生情况。

1.5 主要观察指标 各组支架对大鼠牙周膜干细胞增殖、迁移、成骨分化及成血管的影响, 以及各组大鼠牙槽骨缺损修复效果。

1.6 统计学分析 利用 SPSS 23.0 软件进行统计处理, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 格式表达, 采用单因素方差分析及事后 Turkey 检验对实验结果进行分析, 检验水准 $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ 认定为差异有显著性意义。该文统计学方法已经承德医学院附属医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 支架对大鼠牙周膜干细胞增殖的影响 CCK-8 检测结果显



示,随着培养时间的延长,各组细胞增殖能力呈增强趋势,与对照组比较,CS/rGO/PDGF-BB-5组、CS/rGO/PDGF-BB-10组、CS/rGO/PDGF-BB-15组、CS/rGO/PDGF-BB-20组支架组细胞增殖能力均增强 ($P < 0.05$),并且以CS/rGO/PDGF-BB-15组细胞增殖能力最强,见图1。

2.2 支架对大鼠牙周膜干细胞迁移的影响 Transwell 小室实验结果显示,与对照组比较,CS/rGO/PDGF-BB-5组、CS/rGO/PDGF-BB-10组、CS/rGO/PDGF-BB-15组、CS/rGO/PDGF-BB-20组细胞迁移数量显著增加 ($P < 0.05$),其中CS/rGO/PDGF-BB-15组细胞迁移数量最多,见图2。

2.3 支架的缓释性能检测结果 综合细胞增殖与细胞迁移实验结果,后续实验均选择促进细胞增殖与迁移能力最强的CS/rGO/PDGF-BB-15支架。总共检测了42d内的血小板衍生生长因子BB释放情况,结果显示:在前期的1-7d内,CS/rGO/PDGF-BB-15支架释放了大量的血小板衍生生长因子BB,显示突释现象;在此后的时间段内,支架缓慢释放血小板衍生生长因子BB,见图3。

2.4 支架对大鼠牙周膜干细胞成骨分化的影响 碱性磷酸酶染色结果显示,随着成骨诱导时间的延长,各组碱性磷酸酶阳性面积增加,其中CS/rGO/PDGF-BB-15组碱性磷酸酶阳性染色面积最大,见图4。碱性磷酸酶定量分析结果显示,相同成骨诱导培养时间下,CS/rGO/PDGF-BB-15组磷酸酶活性大于对照组、CS/rGO组 ($P < 0.05$),CS/rGO组碱性磷酸酶活性大于对照组 ($P < 0.05$),见图4。

茜素红染色结果显示,随着成骨诱导时间的延长,各组茜素红阳性染色面积增加,其中CS/rGO/PDGF-BB-15组茜素红阳性染色面积最大,见图5。茜素红染色定量分析结果显示,相同成骨诱导培养时间下,CS/rGO/PDGF-BB-15组钙结节沉积吸光度值大于对照组、CS/rGO组 ($P < 0.05$),CS/rGO组钙结节沉积吸光度值大于对照组 ($P < 0.05$),见图5。

2.5 支架对大鼠牙周膜干细胞血管形成的影响 显微镜下可见3组均形成了毛细血管网络,其中CS/rGO/PDGF-BB-15组毛细血管网络最明显,见图6。各组毛细血管网络中小管节点数、小管节段数量、小管总长度与小管网格数量统计结果,见表2。CS/rGO/PDGF-BB-15组毛细血管网络中小管节点数、小管节段数量、小管总长度与小管网格数量均多于对照组、CS/rGO组 ($P < 0.05$),对照组与CS/rGO组毛细血管网络中小管节点数、小管节段数量、小管总长度与小管网格数量比较差异均无显著性意义 ($P > 0.05$)。

qRT-PCR 检测结果显示,CS/rGO/PDGF-BB-15组血管内皮生长因子、干细胞因子、碱性成纤维细胞生长因子的mRNA表达均高于对照组、CS/rGO组 ($P < 0.05$),对照组与

表2 | 各组大鼠牙周膜干细胞毛细血管网络中小管节点数、小管分段数量、小管长度与小管网格数量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 | Number of tubule nodes, number of tubule segments, length of tubules and number of tubule meshes in the capillary network of periodontal ligament stem cells of rats in each group

组别	小管节点数	小管节段数量 ($\times 10^2$)	小管长度 ($\times 10^3$)	小管网格数量
对照组	156.23±26.05	28.19±6.27	9.69±0.33	10.25±3.54
CS/rGO组	159.45±19.52	30.66±5.83	11.28±1.24	12.09±3.99
CS/rGO/PDGF-BB-15组	524.67±95.21 ^{ab}	98.57±10.22 ^{ab}	19.34±3.97 ^{ab}	56.38±10.68 ^{ab}

表注:CS为壳聚糖,rGO为还原氧化石墨烯,PDGF-BB为血小板衍生生长因子BB。与对照组比较,^a $P < 0.05$;与CS/rGO组比较,^b $P < 0.05$ 。

CS/rGO组血管内皮生长因子、干细胞因子、碱性成纤维细胞生长因子的mRNA表达比较差异均无显著性意义 ($P > 0.05$),见图7。

2.6 支架修复大鼠牙槽骨缺损实验

2.6.1 实验动物数量分析 16只SD大鼠全部进入结果分析。

2.6.2 Micro CT扫描结果 空白对照组可见明显的骨缺损痕迹,骨修复效果最差;其余3组均可见不同程度的骨缺损修复效果,其中实验组骨缺损修复效果最显著,并且还可见单纯支架组骨缺损修复效果要好于对照组,见图8。

量化分析结果显示,实验组骨体积分数、骨小梁数量大于空白对照组、对照组、单纯支架组 ($P < 0.05$),骨小梁间隙小于空白对照组、对照组、单纯支架组 ($P < 0.05$);单纯支架组骨体积分数、骨小梁数量大于空白对照组、对照组 ($P < 0.05$),骨小梁间隙小于空白对照组、对照组 ($P < 0.05$);对照组骨体积分数、骨小梁数量大于空白对照组 ($P < 0.05$),骨小梁间隙小于空白对照组 ($P < 0.05$);4组之间骨小梁厚度比较无显著性意义 ($P > 0.05$),见表3。

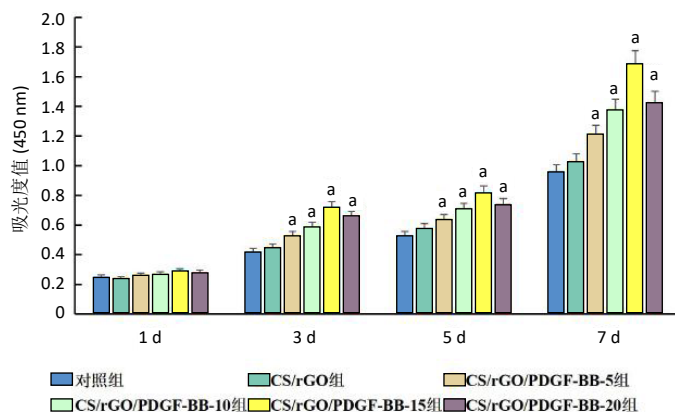
表3 | 各组大鼠牙槽骨缺损部位 Micro CT 扫描定量分析 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 3 | Quantitative analysis of alveolar bone defects in rats in each group by Micro CT scanning

组别	骨体积分数 (%)	骨小梁数量 (/mm)	骨小梁厚度 (mm)	骨小梁间隙 (mm)
空白对照组	29.35±6.31	4.39±0.38	0.29±0.04	0.38±0.05
对照组	36.96±9.88 ^a	5.99±0.21 ^a	0.30±0.01	0.31±0.03 ^a
单纯支架组	45.97±6.11 ^{ab}	6.38±0.57 ^{ab}	0.31±0.02	0.27±0.01 ^{ab}
实验组	62.67±7.45 ^{abc}	8.39±1.14 ^{abc}	0.32±0.05	0.19±0.02 ^{abc}

表注:空白对照组不进行任何干预,单纯支架组植入壳聚糖/还原氧化石墨烯/血小板衍生生长因子BB(15 mg/L)支架,对照组植入壳聚糖/还原氧化石墨烯支架与大鼠牙周膜干细胞复合物,实验组植入壳聚糖/还原氧化石墨烯/血小板衍生生长因子BB(15 mg/L)支架与大鼠牙周膜干细胞复合物。与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与对照组比较,^b $P < 0.05$;与单纯支架组比较,^c $P < 0.05$ 。

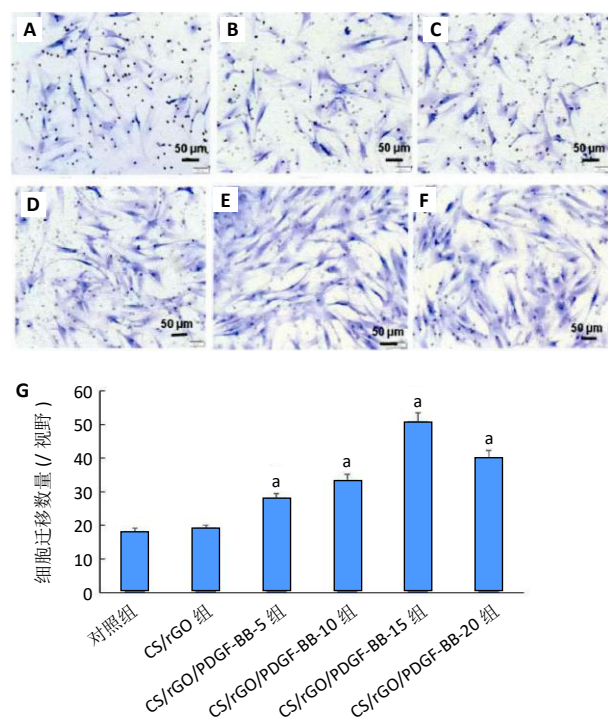
2.6.3 苏木精-伊红染色结果 空白对照组仅见少量的新骨形成,对照组、单纯支架组可见较多的新骨形成,并且对照组骨组织中可见新生血管分布,实验组可见大量的新骨形成,并且骨组织中可见大量的新生血管分布,见图9。



图注: CS 为壳聚糖, rGO 为还原氧化石墨烯, PDGF-BB 为血小板衍生生长因子 BB。与对照组比较, $^aP < 0.05$ 。

图 1 | 各组支架对大鼠牙周膜干细胞增殖的影响

Figure 1 | Effect of scaffolds on the proliferation of rat periodontal stem cells in each group



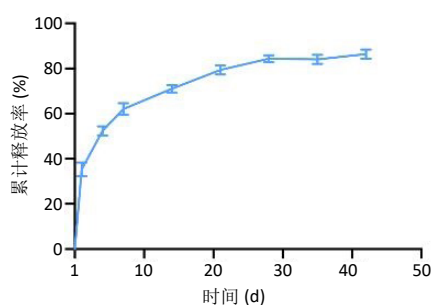
图注: CS 为壳聚糖, rGO 为还原氧化石墨烯, PDGF-BB 为血小板衍生生长因子 BB。图 A-F 分别为对照组、CS/rGO 组、CS/rGO/PDGF-BB-5 组、CS/rGO/PDGF-BB-10 组、CS/rGO/PDGF-BB-15 组、CS/rGO/PDGF-BB-20 组细胞迁移图像; G 为各组细胞迁移数量比较。与对照组比较, $^aP < 0.05$ 。

图 2 | 各组支架对大鼠牙周膜干细胞迁移的影响

Figure 2 | Effect of scaffolds on rat periodontal stem cell migration in each group

3 讨论 Discussion

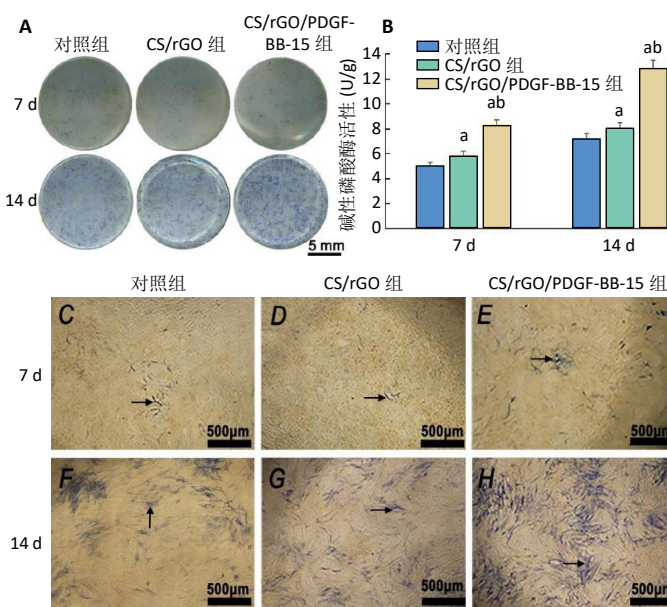
生长因子作为大分子蛋白存在半衰期短、易分解等问题, 将生长因子负载到适宜的生物材料支架上可使其缓慢持续释放, 维持有效的作用浓度, 成为目前研究的热点话题。LIU 等^[20] 采用负载神经生长因子的壳聚糖支架修复成年大鼠坐骨神经节段 (20 mm) 缺损, 8 周后可见明显的运动和感觉功能恢复, 组织学观察显示再生的坐骨神经不仅与神经元重



图注: 在前期的 1-7 d 内, 支架释放了大量的血小板衍生生长因子 BB, 显示突释现象; 在此后的时间段内, 支架缓慢释放血小板衍生生长因子 BB。

图 3 | 壳聚糖 / 还原氧化石墨烯 / 血小板衍生生长因子 BB 支架的缓释性能

Figure 3 | Sustained release performance of chitosan/reduced graphene oxide/platelet-derived growth factor BB scaffold

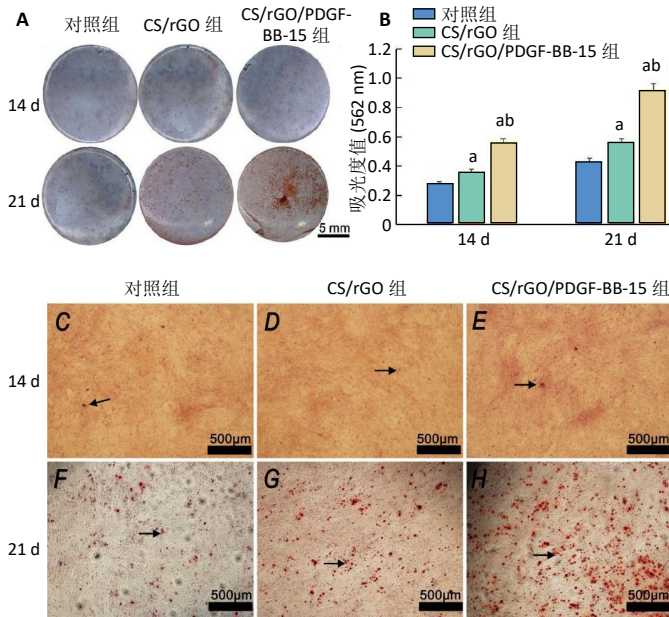


图注: CS 为壳聚糖, rGO 为还原氧化石墨烯, PDGF-BB 为血小板衍生生长因子 BB。图 A 为碱性磷酸酶染色整体图像; C-H 为碱性磷酸酶染色局部放大图像, 箭头指示阳性染色; B 为碱性磷酸酶活性定量分析。与对照组比较, $^aP < 0.05$; 与 CS/rGO 组比较, $^bP < 0.05$ 。

图 4 | 各组大鼠牙周膜干细胞成骨分化碱性磷酸酶活性检测

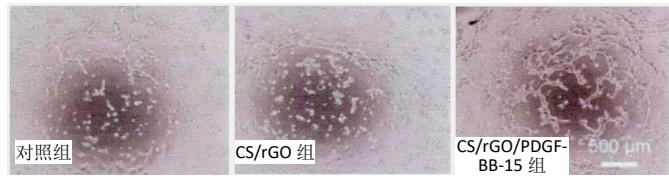
Figure 4 | Detection of alkaline phosphatase activity of osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells in each group of rats

新连接, 还重建了与中枢神经系统的神经回路, 表明该新型仿生支架能够促进坐骨神经扩展缺损的再生和功能回路的重建。ZHOU 等^[21] 利用氧化石墨烯薄片吸附转化生长因子 $\beta 3$ 并掺入胶原蛋白水凝胶中, 结果显示氧化石墨烯薄片对转化生长因子 $\beta 3$ 的吸附率 $> 99\%$ 、释放率 $< 1.7\%$, 表明氧化石墨烯薄片可以高效地在 3D 环境中递送生长因子, 以引导相同支架中的细胞并诱导组织形成。SANMUGAM 等^[22] 研究构建了壳聚糖 / 还原氧化石墨烯 / 氧化铷药物递送载体, 结果显示该载体具有良好的理化性能, 有利于 NIH3T3 细胞的黏附, 并发挥金黄色葡萄球菌和大肠杆菌抑制作用。以上研究结果说明, 壳聚糖 / 还原氧化石墨烯支架适宜作为生长因子与药物的载体。结合以往文献与预实验结果^[23], 此次实验将不同



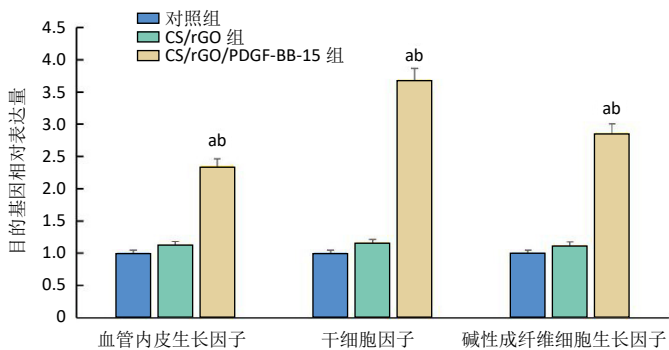
图注: CS 为壳聚糖, rGO 为还原氧化石墨烯, PDGF-BB 为血小板衍生生长因子 BB。图 A 为茜素红染色整体图像; C-H 为茜素红染色局部放大图像, 箭头指示钙结节; B 为钙结节沉积定量分析。与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 CS/rGO 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

图 5 | 各组大鼠牙周膜干细胞成骨分化钙结节沉积分析
Figure 5 | Analysis of calcium nodule deposition in osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells in each group of rats



图注: CS 为壳聚糖, rGO 为还原氧化石墨烯, PDGF-BB 为血小板衍生生长因子 BB。CS/rGO/PDGF-BB-15 组毛细血管网络形成明显优于对照组、CS/rGO 组。

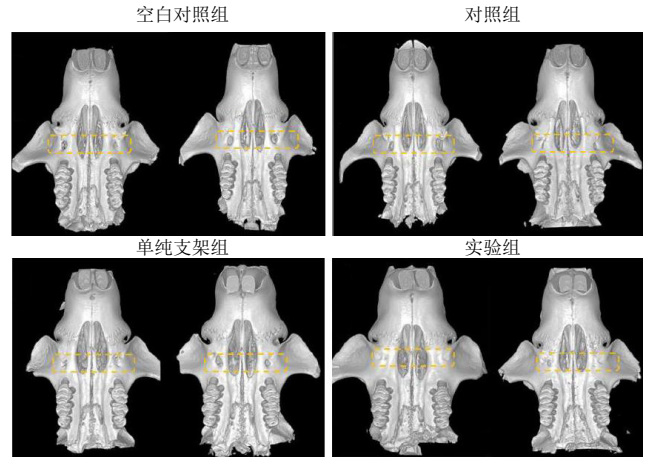
图 6 | 各组大鼠牙周膜干细胞毛细血管网络形成观察
Figure 6 | Observation of capillary network formation of periodontal ligament stem cells in rats of each group



图注: CS 为壳聚糖, rGO 为还原氧化石墨烯, PDGF-BB 为血小板衍生生长因子 BB。与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 CS/rGO 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

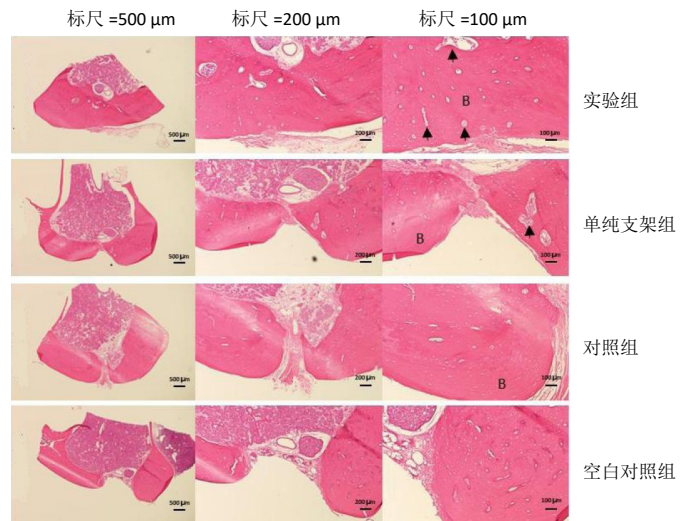
图 7 | 各组大鼠牙周膜干细胞中血管内皮生长因子、干细胞因子、碱性成纤维细胞生长因子的 mRNA 表达

Figure 7 | mRNA expression levels of vascular endothelial growth factor, stem cell factor and basic fibroblast growth factor in periodontal stem cells of rats in each group



图注: 空白对照组不进行任何干预, 单纯支架组植入壳聚糖 / 还原氧化石墨烯 / 血小板衍生生长因子 BB(15 mg/L) 支架, 对照组植入壳聚糖 / 还原氧化石墨烯支架与大鼠牙周膜干细胞复合物, 实验组植入壳聚糖 / 还原氧化石墨烯 / 血小板衍生生长因子 BB(15 mg/L) 支架与大鼠牙周膜干细胞复合物。空白对照组可见明显的骨缺损痕迹, 骨修复效果最差; 其余 3 组均可见不同程度的骨缺损修复效果, 其中实验组骨缺损修复效果最显著。

图 8 | 各组大鼠上颌牙槽骨的 Micro CT 扫描图像
Figure 8 | Micro CT images of maxillary bone of rats in each group



图注: 空白对照组不进行任何干预, 单纯支架组植入壳聚糖 / 还原氧化石墨烯 / 血小板衍生生长因子 BB(15 mg/L) 支架, 对照组植入壳聚糖 / 还原氧化石墨烯支架与大鼠牙周膜干细胞复合物, 实验组植入壳聚糖 / 还原氧化石墨烯 / 血小板衍生生长因子 BB(15 mg/L) 支架与大鼠牙周膜干细胞复合物。实验组可见大量的新骨形成, 并且骨组织中可见大量的新生血管分布, 骨修复效果最好。B 代表骨组织, 箭头指示血管。

图 9 | 各组大鼠牙槽骨缺损部位的苏木精 - 伊红染色图像
Figure 9 | Hematoxylin-eosin staining images of alveolar bone defects in rats of each group

质量浓度 (5, 10, 15, 20 mg/L) 的血小板衍生生长因子负载于壳聚糖 / 还原氧化石墨烯支架中, 观察其对大鼠牙周膜干细胞增殖与迁移的影响, 结果显示负载不同浓度血小板衍生生长因子的壳聚糖 / 还原氧化石墨烯支架均可促进大鼠牙周膜干细胞的增殖与迁移, 并且以负载 15 mg/L 血小板衍生生长因子 BB 组促进大鼠牙周膜干细胞增殖与迁移的作用最显

著。以往研究已证实，血小板衍生生长因子 BB 可促进牙周膜干细胞的增殖与迁移^[24]，此次实验获得了与以往研究结果一致的结论，说明将血小板衍生生长因子 BB 负载于壳聚糖/还原氧化石墨烯支架中依然可以发挥其生物学作用。Elisa 检测结果显示，壳聚糖/还原氧化石墨烯支架早期可大量快速释放血小板衍生生长因子 BB 发挥生物学效应，后期缓慢持续释放血小板衍生生长因子 BB，为充分发挥血小板衍生生长因子 BB 的生物学效应提供基础。

骨组织再生是涉及多方面的复杂过程，缺损区域及其周围干细胞的募集在损伤初期至关重要，随后是血管的形成，充足的干细胞与血液供应是生物材料与组织相互作用的关键，最后促进成骨^[25]。牙槽骨内含有丰富的毛细血管，因此血管形成是骨组织修复的必要条件：氧气与营养物质可通过血液循环运输至缺损部位，同时带走代谢产物；间充质干细胞可通过血液循环聚集至缺损部位，参与骨组织的修复。KIM 等^[26]研究显示，血小板衍生生长因子 BB 可促进骨髓来源内皮祖细胞的增殖、迁移与成血管能力。SU 等^[27]研究发现，来源于破骨前细胞的血小板衍生生长因子 BB 是骨关节炎发展过程中病理性软骨下骨血管生成的关键驱动因素。GUO 等^[28]研究结果证实，外源性给予血小板衍生生长因子 BB 可上调新生缺氧肺动脉高压大鼠增殖细胞核抗原表达，促进肺血管重构。此次实验结果显示，与对照组比较，CS/rGO 支架对基质胶上大鼠牙周膜干细胞的血管网络形成与成血管基因表达无明显的影响，而 CS/rGO/PDGF-BB-15 支架可促进基质胶上大鼠牙周膜干细胞的血管网络形成与成血管基因表达，说明支架中的血小板衍生生长因子 BB 可促进大鼠牙周膜干细胞的成血管分化，获得了与以往研究一致的结论。除了促血管形成作用，血小板衍生生长因子 BB 还可促进干细胞的成骨分化。此次实验结果显示，与对照组比较，CS/rGO 支架可促进大鼠牙周膜干细胞的成骨分化，而 CS/rGO/PDGF-BB-15 支架的促细胞成骨分化作用强于 CS/rGO 支架，说明血小板衍生生长因子 BB 协同壳聚糖/还原氧化石墨烯支架显著促进了大鼠牙周膜干细胞的成骨向分化。

为进一步评估 CS/rGO/PDGF-BB-15 支架的促骨形成作用，进行了大鼠牙槽骨缺损修复实验。Micro CT 可以精确观察到骨再生过程中骨组织的微小变化，评估骨密度、软骨骨化情况来评估骨再生以及软骨中的钙质沉积变化情况。Micro CT 扫描结果显示，CS/rGO/PDGF-BB-15 支架的骨缺损修复作用强于 CS/rGO 支架联合大鼠牙周膜干细胞移植，分析认为可能是支架中的血小板衍生生长因子 BB 促进了外周干细胞的增殖、迁移与成血管分化，进而促进成骨；而 CS/rGO/PDGF-BB-15 支架联合大鼠牙周膜干细胞的骨缺损修复作

用强于单纯的 CS/rGO/PDGF-BB-15 支架，说明支架中的血小板衍生生长因子 BB 促进了大鼠牙周膜干细胞的增殖、迁移与成血管、成骨分化，进而促进骨修复。苏木精-伊红染色进一步验证了 Micro CT 扫描结果。以往研究结果显示，血小板衍生生长因子 BB 可通过激活丝裂原活化蛋白激酶与磷脂酰肌醇 3 激酶信号通路、抑制 p53/p21 信号通路促进间充质干细胞的增殖^[29-30]，通过 Ras/ERK1/2 信号通路调控精原干细胞的增殖^[31]，通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调节干细胞的成骨分化^[32]，通过磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 和细胞外调节蛋白激酶 1/2 信号通路调控人脐静脉内皮细胞的迁移和血管生成^[33]。

综上所述，负载血小板衍生生长因子 BB 的壳聚糖/还原氧化石墨烯支架可通过促进大鼠牙周膜干细胞的增殖、迁移、成血管与成骨分化，进而有效促进大鼠牙槽骨缺损的修复。但是研究还有许多不足之处，例如：未进一步探寻血小板衍生生长因子的最佳负载浓度；对于动物实验仅设置了一个时间点，未动态观察骨修复效应，未进行血管形成的组织学观察；另外，未进一步分析血小板衍生生长因子 BB 的作用机制，这些将在后续实验中进行。

作者贡献：白相宇进行实验设计，实验实施为白相宇、霍峰，实验评估为郝妍，资料收集为王泽成、郭晓宇，白相宇成文，霍峰审核。

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。

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。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守了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。

4 参考文献 References

- [1] FAN Y, CUI C, ROSEN CJ, et al. Klotho in Osx(+)-mesenchymal progenitors exerts pro-osteogenic and anti-inflammatory effects during mandibular alveolar bone formation and repair. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):155.
- [2] LU J, WANG Z, ZHANG H, et al. Bone Graft Materials for Alveolar Bone Defects in Orthodontic Tooth Movement. *Tissue Eng Part B Rev.* 2022;28(1):35-51.
- [3] HOLLÝ D, KLEIN M, MAZREKU M, et al. Stem Cells and Their Derivatives- Implications for Alveolar Bone Regeneration: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11746.

- [4] KOUSHIK TM, MILLER CM, ANTUNES E. Bone Tissue Engineering Scaffolds: Function of Multi-Material Hierarchically Structured Scaffolds. *Adv Healthc Mater.* 2023;12(9):e2202766.
- [5] LEKHAVADHANI S, SHANMUGAVADIVU A, SELVAMURUGAN N. Role and architectural significance of porous chitosan-based scaffolds in bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* 2023;251:126238.
- [6] WANG S, ZHANG Y, SHI Y, et al. Rhubarb charcoal-crosslinked chitosan/silk fibroin sponge scaffold with efficient hemostasis, inflammation, and angiogenesis for promoting diabetic wound healing. *Int J Biol Macromol.* 2023;253(Pt 2):126796.
- [7] ZHAO Y, PENG X, XU X, et al. Chitosan based photothermal scaffold fighting against bone tumor-related complications: Recurrence, infection, and defects. *Carbohydr Polym.* 2023;300:120264.
- [8] MANIKANDAN V, LEE NY. Reduced graphene oxide: Biofabrication and environmental applications. *Chemosphere.* 2023;311(Pt 1):136934.
- [9] UMEKAR MS, BHUSARI GS, POTBHARE AK, et al. Bioinspired Reduced Graphene Oxide Based Nanohybrids for Photocatalysis and Antibacterial Applications. *Curr Pharm Biotechnol.* 2021;22(13):1759-1781.
- [10] 魏小翠, 穆睿, 毕博, 等. 氧化石墨烯修饰三维氧化钙骨组织工程支架的制备及细胞相容性研究 [J]. *医学研究生学报*, 2019,32(8):797-802.
- [11] 毕博. 还原氧化石墨烯修饰壳聚糖骨组织工程支架的制备和表征 [D]. 广州: 南方医科大学, 2021.
- [12] CAO J, ZHANG Q, YANG Q, et al. Epigenetic regulation of osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells in periodontitis. *Oral Dis.* 2023;29(7):2529-2537.
- [13] MAO B, WANG M, WAN S. Platelet derived growth factor and its receptor in intracerebral hemorrhage. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2022;51(5):634-639.
- [14] 陈佳娜, 聂敏海, 胡馨月, 等. 血小板衍生生长因子 BB 促进人牙周膜干细胞的增殖和成骨分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2023,27(10):1534-1540
- [15] 魏琴, 张雪, 马磊, 等. 血小板衍生生长因子 BB 诱导大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2021,25(19):2953-2957
- [16] KAWABATA T, TOKUDA H, KUROYANAGI G, et al. Incretin accelerates platelet-derived growth factor-BB-induced osteoblast migration via protein kinase A: The upregulation of p38 MAP kinase. *Sci Rep.* 2020;10(1):2341.
- [17] PAN J, DENG J, LUO Y, et al. Thermosensitive Hydrogel Delivery of Human Periodontal Stem Cells Overexpressing Platelet-Derived Growth Factor-BB Enhances Alveolar Bone Defect Repair. *Stem Cells Dev.* 2019;28(24):1620-1631.
- [18] 姜涛, 马磊, 李志强, 等. 血小板衍生生长因子 BB 诱导骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2021,25(25):3937-3942.
- [19] 毕博, 臧圣奇, 何懋典, 等. 还原氧化石墨烯修饰壳聚糖骨组织工程支架的制备及表征 [J]. *医学研究生学报*, 2021,34(4):350-356.
- [20] LIU FD, DUAN HM, HAO F, et al. Biomimetic chitosan scaffolds with long-term controlled release of nerve growth factor repairs 20-mm-long sciatic nerve defects in rats. *Neural Regen Res.* 2022;17(5):1146-1155.
- [21] ZHOU M, LOZANO N, WYCHOWANIEC JK, et al. Graphene oxide: A growth factor delivery carrier to enhance chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in 3D hydrogels. *Acta Biomater.* 2019;96:271-280.
- [22] SANMUGAM A, ABBISHEK S, KUMAR SL, et al. Synthesis of chitosan based reduced graphene oxide-CeO(2) nanocomposites for drug delivery and antibacterial applications. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2023;145:106033.
- [23] 赵金龙, 刘继超, 于洋. 聚己内酯和 β -磷酸三钙复合支架经血小板衍生生长因子 BB 修饰后的促血管生成作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2023,27(21):3300-3306.
- [24] 邓佳佳, 潘杰, 於丽明, 等. 血小板衍生生长因子 BB 对牙周膜干细胞生物学特性的影响 [J]. *上海口腔医学*, 2020,29(4):343-349.
- [25] DONOS N, AKCALI A, PADHYE N, et al. Bone regeneration in implant dentistry: Which are the factors affecting the clinical outcome? *Periodontol 2000.* 2023;93(1):26-55.
- [26] KIM DY, PARK G, HONG HS, et al. Platelet-Derived Growth Factor-BB Priming Enhances Vasculogenic Capacity of Bone Marrow-Derived Endothelial Precursor Like Cells. *Tissue Eng Regen Med.* 2023;20(5):695-704.
- [27] SU W, LIU G, LIU X, et al. Angiogenesis stimulated by elevated PDGF-BB in subchondral bone contributes to osteoarthritis development. *JCI Insight.* 2020;5(8):e135446.
- [28] GUO X, LI MX, BAYER C, et al. [Effect of platelet-derived growth factor-BB on pulmonary vascular remodeling in neonatal rats with hypoxic pulmonary hypertension and its mechanism]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2023;25(4):407-414.
- [29] LI X, QUAN H, HE J, et al. The role of platelet-derived growth factor BB signaling pathway in the regulation of stem and progenitor Leydig cell proliferation and steroidogenesis in male rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2023;233:106344.
- [30] ZHANG JM, FENG FE, WANG QM, et al. Platelet-Derived Growth Factor-BB Protects Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Derived From Immune Thrombocytopenia Patients Against Apoptosis and Senescence and Maintains MSC-Mediated Immunosuppression. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(12):1631-1643.
- [31] REN F, FANG Q, XI H, et al. Platelet-derived growth factor-BB and epidermal growth factor promote dairy goat spermatogonial stem cells proliferation via Ras/ERK1/2 signaling pathway. *Theriogenology.* 2020;155:205-212.
- [32] DENG J, PAN J, LUO Y, et al. The platelet derived growth factor BB promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells via the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Arch Oral Biol.* 2021;129:105162.
- [33] ZHANG M, YU W, NIIBE K, et al. The Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB on Bone Marrow Stromal Cell-Mediated Vascularized Bone Regeneration. *Stem Cells Int.* 2018;2018:3272098.

(责任编辑: 关伟, 邱杨, 张楠)