

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.08.002

富血小板纤维蛋白对兔骨髓间充质干细胞成软骨分化的影响*

雍志军¹ 贾帅军² 韩林章³ 周翔¹ 户刚¹ 郝赋¹ 刘建^{1△}

(1 第四军医大学西京医院骨科 陕西 西安 710032; 2 武警陕西省总队医院骨科 陕西 西安 710054;

3 解放军总后勤部机关第一门诊部 北京 100842)

摘要 目的:观察自体富血小板纤维蛋白(platelet-rich fibrin, PRF)对体外培养的兔骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成软骨分化的影响。**方法:**兔心脏采血制备 PRF, 电镜观察其超微结构;分离培养兔 BMSCs, 取第 3 代细胞用于实验, 分为 PRF 组、阳性对照组、空白对照组。诱导培养 21d 后, 对三组细胞分别进行形态学观察, 成软骨鉴定染色(甲苯胺蓝、II 型胶原免疫组化染色), 软骨相关基因表达检测(II 型胶原、Aggrecan、SOX9)。**结果:**PRF 组和阳性对照组中 BMSCs 经诱导后, 细胞由长梭形变为三角形、多角形、圆形;甲苯胺蓝、II 型胶原免疫组化染色均为阳性;II 型胶原、Aggrecan、SOX9 基因表达水平均较高, 两组比较无统计学差异, 空白对照组未见相关分化现象。**结论:**PRF 在体外可促进兔 BMSCs 成软骨分化, 可作为自体生物材料, 在构建组织工程软骨中发挥更好的作用。

关键词:富血小板纤维蛋白;骨髓间充质干细胞;成软骨分化;组织工程

中图分类号:Q95-3, R318.08, R68 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)08-1407-04

Effect of Platelet-rich Fibrin on Chondrogenic Differentiation of Rabbit Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*

YONG Zhi-jun¹, JIA Shuai-jun¹, HAN Lin-zhang², ZHOU Xiang¹, HU Gang¹, HAO Fu¹, LIU Jian^{1△}

(1 Department of orthopedics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of orthopedics, Shaanxi Provincial Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Forces, Xi'an, Shaanxi, 710054, China;

3 First Clinic Department of GLD of PLA, Beijing, 100842, China)

ABSTRACT Objective:To investigate the effect of autologous platelet rich fibrin (PRF) on chondrogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) *in vitro*. **Methods:** Blood extracted from rabbit's heart was used to prepare PRF, and the ultrastructure of PRF was observed by electron microscope. BMSCs were isolated and cultured *ex vivo*. BMSCs at passage 3 were divided into three groups: PRF group, positive control group and blank control group. After 2 weeks of culture, the morphology of cells in each group were observed by phase-contrast microscope, the phenotype was identified with toluidine blue staining and collagen II immunocytochemistry, and the gene expression levels of collagen type II, Aggrecan, SOX 9 were detected by Real-time PCR. **Results:** Phase-contrast microscope showed that inducing BMSCs of PRF group and positive control group grew from long spindle to triangle, polygon, and circle. The toluidine blue staining and collagen II immunocytochemistry of two groups were positive, gene expression levels of collagen type II, Aggrecan, and SOX 9 were high, there was no statistical difference between two groups. However, cells in the control group were not detected these changes. **Conclusion:** PRF could promote chondrogenic differentiation of BMSCs *in vitro*. It can be used as autologous biological materials, and it will play an important role in constructing tissue engineering cartilage.

Key words: Platelet-rich fibrin; Bone marrow mesenchymal stem cells; Chondrogenic differentiation; Tissue engineering

Chinese Library Classification: Q95-3, R318.08, R68 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)08-1407-04

前言

关节软骨具有特殊的致密结构, 由于创伤、退变、感染及其它因素导致的损伤常常难以自身修复。目前临床所使用的各种关节软骨治疗方法均存在某些不足之处, 如供体来源有限、易继发免疫排斥反应等, 且大多为纤维软骨修复, 缺乏透明软骨优良的力学性能, 远期修复效果尚不满意^[1]。组织工程技术的发展, 为软骨修复与再生提供了新的思路^[2]。骨髓间充质干细胞

(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 具有自我增殖和多向分化的潜能, 取材简便、培养技术成熟、免疫排斥反应小, 被认为是软骨组织工程中较为理想的种子细胞之一^[3]。关节软骨缺损修复过程, 主要是在特殊的微环境下, 通过各种生长因子诱导 BMSCs 分化成软骨细胞^[4]。单一生长因子诱导 BMSCs 向软骨细胞分化效果欠佳且价格昂贵, 而联合应用多种生长因子修复软骨的方法逐渐受到重视。富血小板纤维蛋白(platelet-rich fibrin, PRF)是由自体血液离心制备而成, 以血小

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划“863 计划”(434112082); 国家自然科学基金项目(50675108)

作者简介: 雍志军(1985-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 骨与软骨缺损修复, 电话: 18240888098, E-mail: abc19851202@163.com

△通讯作者: 刘建, 电话: 029-84771013, E-mail: ljreny@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2013-09-27 接受日期: 2013-10-19)

板凝胶形式呈现,富含高浓度的血小板、多种生长因子和大量的纤维蛋白,其中纤维蛋白与血小板释放的生长因子以化学键的方式结合起来,能缓慢释放生长因子从而延长作用时间^[56]。目前针对 PRF 诱导 BMSCs 成软骨分化的研究尚少,本实验旨在研究自体 PRF 对体外培养的兔 BMSCs 成软骨分化影响,为 PRF 应用于组织工程软骨提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂 胎牛血清 (FBS)、DMEM 高糖培养基(Gibco, USA),转化生长因子- β 3(TGF- β 3)(Peprotech, USA),牛胰岛素-转铁蛋白硒钠(ITS Premix)(BD, Franklin Lakes, USA),地塞米松、维生素 C、丙酮酸钠、脯氨酸、青霉素-链霉素双抗、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶(Sigma, USA),II 型胶原单克隆抗体(433120; Invitrogen, USA),羊抗鼠 IgG SP 试剂盒(SP-9002)、DAB 试剂盒(ZLI-9032,北京中杉)。

1.1.2 主要仪器 细胞培养箱 (Nuair, USA), 倒置显微镜 (Nikon, Japan), 光学显微镜及摄像系统 (Olympus, Japan), 扫描电子显微镜 (Hitachi, S-3400N, Japan)。

1.1.3 实验动物 3-4 月龄新西兰纯种大白兔 4 只,体重 2.0-3.0 kg,由第四军医大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(陕)2006-001。购入后严格按照国家部属实验动物管理委员会制定的实验动物饲养条件进行标准饲养 3 周。实验对动物的处理方法符合第四军医大学伦理委员会对实验动物的相关规定。

1.2 实验方法

1.2.1 兔 BMSCs 提取与培养 取 2.0~2.5 kg 新西兰大白兔麻醉后固定于实验台上,常规膝关节备皮、消毒、铺巾,单侧胫骨平台穿刺抽取骨髓 2 mL,将细胞置于体积分数 10 %FBS 的 DMEM 培养基(含青霉素和链霉素各 100 U/ml),重悬后接种于 25 mL 塑料培养瓶,置于 37 °C、5 %CO₂ 的细胞培养箱培养。取第 3 代 BMSCs 备用。

1.2.2 PRF 制备 兔胫骨取 BMSCs 后,于兔左胸部心脏部位常

规备皮、消毒、铺巾,于心脏跳动最明显处穿刺采血 20 mL,将血液配平注入纱布包裹的两个相同 10 mL 玻璃无菌离心管中离心(3000 r/min、10 min),静置 10 min 后弃去上清,取出中间部分,剪除其下部红细胞碎片层,即获得 PRF 凝胶,以无菌纱布挤压后制成 PRF 膜片。

1.2.3 扫描电镜标本制作 将新鲜 PRF 标本以 2.5 %戊二醛 4 °C 固定 4 h,1 %锇酸固定 1~2 h,梯度乙醇脱水,乙醇与醋酸异戊酯(体积 1:1)混合液浸泡标本 30 min,再用纯醋酸异戊酯处理 1~2 h,CO₂ 临界点干燥,金离子溅射法镀膜。Hitachi S-3400N 扫描电镜观察并采集图像。

1.2.4 BMSCs 成软骨诱导分组 取第 3 代 BMSCs 调整细胞密度为 4×10^5 mL,接种于置有盖玻片的六孔板中,继续培养 24 h 后,随机分成三组。空白对照组加入含 10 %FBS 的 DMEM 培养液;PRF 组放入 PRF 膜片及含 10 %FBS 的 DMEM 培养液;阳性对照组加入含 10 %FBS 的成软骨诱导液(DMEM 培养液中加入 10^{-7} mol/L 地塞米松、50 μ g/mL 维生素 C、10 ng/mL TGF- β 3、40 μ g/mL 脯氨酸、100 μ g/mL 丙酮酸钠、50 mg/mL ITS Premix)。

1.2.5 成软骨鉴定染色 于体外培养 21 d 后取出细胞爬片,行甲苯胺蓝染色和 II 型胶原免疫组化染色^[7],以检测细胞成软骨分化情况。

1.2.6 RT-PCR 检测 诱导 21 d 后,收集各组培养板中的细胞,检测 II 型胶原、Aggrecan、SOX9 的 mRNA 表达。根据 GeneBank 公布的兔 II 型胶原、Aggrecan、SOX9cDNA 序列,采用 Primer 5.0 设计引物序列,并用 NCBI 中的 Blast 程序进行核酸序列相似性比较和引物特异性分析(表 1)。RNA 的提取按 Trizol 的说明书进行,用 Trizol 试剂处理各组的 BMSCs,提取细胞总 RNA。取 500ng 用于逆转录,取逆转录得到的 cDNA,采用 TAKARA 2 $\times$ DYBR Premix DimerEvaser 建立反应体系,将各反应管放入 ABI PRISM 7500 定量 PCR 仪,按下列条件扩增:95 °C 5 min,然后按 95 °C 15 s,60 °C 60 s,45 个循环。以 GAPDH 作为内参照,用 LightCycler Software Ver.4.0 分析目的基因的相对表达水平。

表 1 引物设计

Table 1 Primer Design

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
GAPDH	5'-TCGTCCTCTCTGGTGCTCT-3'	5'-CCACTTTGTGAAGCTCATTTCTCT-3'
COL-II	5'-TATCCAGTAGTCACCGCTCTTCC-3'	5'-ACGCTCAAGTCCCTCAACAAC-3'
Aggrecan	5'-CAATGATGGCGCTGTTCTGT-3'	5'-TGGAGGTCGTGGTGAAAGG-3'
SOX9	5'-GGCTCCGACACCGAGAATAC-3'	5'-TGTCTCTTCTCGTCTCTCTTCT-3'

1.2.7 统计学分析 计量资料结果均表示为均数 $\pm$ 标准差,所有数据都使用 SPASS Statistics 13.0 软件分析,各组之间的两两比较的方法为 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为两组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PRF 大体形态

血液离心后分为三层,分别为贫血小板血浆层、富血小板纤维蛋白、红细胞碎片层。PRF 呈透明白色胶冻状,表面光滑,质地均匀,具有良好的弹性和韧性。经无菌纱布挤压后,形成膜片(见图 1)。

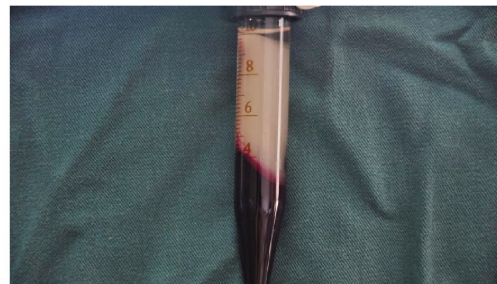


图 1 PRF 大体形态

Fig. 1 Gross appearance of the PRF

2.2 PRF 超微结构

PRF 由大量的纤维蛋白聚集形成疏松多孔的立体网状结构,血小板相互聚集,伸出伪足攀爬粘附于纤维蛋白上,并可见一些白细胞散在分布其间(见图 2)。

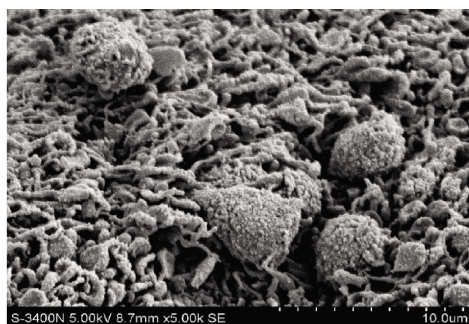


图 2 PRF 扫描电镜照片

Fig. 2 Scanning Electron microscope of PRF

2.3 BMSCs 成软骨诱导形态

第 3 代 BMSCs 细胞形态均匀,长梭形,排列紧密,成漩涡状。PRF 组经诱导培养 8d、阳性对照组 6d 后开始可见少量细胞,由梭形变为三角形、多角形、圆形,随着诱导天数的增加,梭形细胞逐渐减少,圆形、三角形细胞增多,细胞成聚集生长,逐渐成为软骨样结节。

2.4 成软骨染色结果

PRF 组和阳性对照组甲苯胺蓝染色可见软骨细胞呈紫蓝色,细胞基质呈蓝色,软骨细胞内及细胞周围有蓝紫色异染颗粒(见图 3);II 型胶原免疫组化染色可见软骨细胞胞浆及胞膜染成棕黄色,细胞基质内可见少量棕黄色颗粒,胞核不着色。(见图 4)空白对照组染色结果均为阴性。

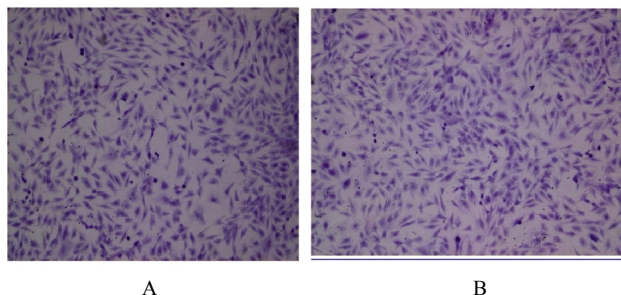


图 3 甲苯胺蓝染色 A.PRF 组; B.阳性对照组

Fig. 3 Toluidine blue staining. A. PRF group;
B. The positive control group

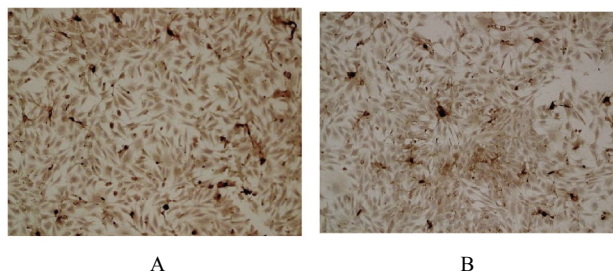


图 4 II 型胶原免疫组化染色 A.PRF 组; B.阳性对照组

Fig.4 Type II collagen immunohistochemical staining. A. PRF group; B. The positive control group

2.5 RT-PCR 结果

诱导 21d 后的细胞经 RT-PCR 扩增后,空白对照组中 II 型胶原、Aggrecan、SOX9 基因表达水平非常低,而 PRF 组和对照组中三种基因表达水平均比较高,且两组结果差异无统计学意义(见图 5)。

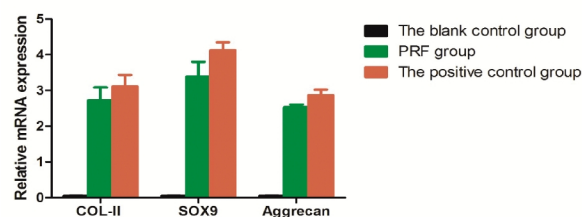


图 5 RT-PCR 检测各组 II 型胶原、蛋白聚糖和 SOX 9 基因表达

Fig. 5 mRNA expression of COL- II, Aggrecan, and SOX9 by RT-PCR

3 讨论

组织工程软骨的三大要素包括支架材料、种子细胞、生长因子^[8]。目前天然和人工合成的生物材料已经得到了广泛应用,但其生物安全性还无法证实,因此自体来源的生物材料越来越受到研究关注^[9]。PRF 作为一种自体生物材料,以血小板凝胶形式呈现,富含高浓度的血小板、多种生长因子和大量的纤维蛋白以及白细胞^[10]。电镜观察可见 PRF 是由纤维蛋白相互聚合构成疏松多孔的纤维网状结构,血小板和白细胞网罗在网状结构中,这与 Dohan 等^[9]认为 PRF 呈类似天然血凝块一样的疏松多孔有序的纤维蛋白网状结构的结果是相符的。纤维蛋白可促进软骨细胞增殖,增加软骨基质的合成与分泌^[11],因其良好的可塑性、黏附性和生物相容性而在组织工程软骨作为支架材料广泛应用^[12-14]。白细胞释放的抗炎因子,具有调节炎症反应和抗感染的能力,加快组织愈合^[12]。

PRF 中血小板通过 α 脱颗粒释放大量的生长因子,主要包括转化生长因子- β (Transforming growth factor beta, TGF- β)、胰岛素样生长因子 (Insulin-like growth factor, IGF)、血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板衍生生长因子 (Platelet derived growth factor, PDGF)、成纤维细胞生长因子 (Fibroblast growth factor, FGF)、表皮生长因子 (Epidermal growth factor, EGF)^[15,16]。BMSCs 向软骨细胞分化的过程中受到相关生长因子、特殊物理环境以及基因等诸多因素的联合调控,其中生长因子的作用及细胞局部微环境起到十分关键的作用。Leah 等^[17]认为 TGF- β 可促进软骨细胞增殖和软骨基质分泌,诱导 BMSCs 向软骨细胞分化,维持软骨细胞表型稳定。Balcom 等^[18]认为 IGF 与 TGF- β 联合应用时具有协同作用,能更好的刺激软骨细胞增殖和软骨基质分泌。VEGF 能显著促进血管再生,对于软骨损伤周围软组织的修复起到十分重要的作用^[19]。FGF 与 PDGF 能显著促进软骨细胞分裂、增殖,促进软骨细胞合成蛋白多糖,加速软骨成熟、分化^[20,21]。PRF 富含血小板及多种高浓度的生长因子,各种因子比例与体内正常比例相符,具有最佳的协同作用,较单一的生长因子诱导 BMSCs 向软骨细胞分化效果更好。

PRF 缓释生长因子,更好的延长了因子作用时间。Su 等^[22]研究发现 10 mL 血液离心出的 PRF 静置 1 小时后 PDGF、TGF- β 、VEGF、IGF、EGF 释放量为 52.37 ng、72.21 ng、1.04 ng、3.23 ng、249.16 ng;6 小时释放量为 29.29 ng、43.06 ng、0.38 ng、0.18 ng、257.40 ng。He 等^[23]研究表明,PRF 中生长因子释放量

随着时间的延长而会缓慢增加,生长因子浓度的高峰在 7-14 天左右出现,而后逐渐减少,但 28 天时仍能检测到生长因子。生长因子缓慢释放,与细胞的生长分化周期相适应,保证了细胞始终处在适宜浓度的生长因子环境中,能更有效的促进细胞的增殖分化和软骨基质的合成。

本实验中 BMSCs 经 PRF 膜片培养 21d 后,对细胞进行软骨鉴定染色,其中甲苯胺蓝染色结果为阳性,提示细胞合成和分泌酸性粘多糖;免疫组化染色结果为阳性,证明细胞合成和分泌软骨细胞特征性 II 型胶原;同时行 RT-PCR 检测成软骨相关基因的表达水平,其中 II 型胶原、Aggrecan、SOX9 三种成软骨基因均出现高表达。以上的实验的结果充分证明了 BMSCs 经 PRF 体外诱导后可以分化为软骨细胞,诱导后的细胞表达软骨细胞的特征。

PRF 制备简单,仅需离心一次,无需特殊仪器,制作方法简单易学,术术前中均可以制备,临床应用简便、快捷^[24]。PRF 完全来自自体血液,来源丰富,价格低廉,制备过程中未使用任何抗凝剂及促凝剂,不存在免疫排斥问题和传播疾病的危险,供区无二次损伤风险,可大量制备使用,生物安全性好,临床应用前景广泛^[25]。但 PRF 还存在以下问题需进一步研究解决:1. PRF 释放的生长因子体内促进 BSMCs 成软骨分化的联合调控具体机制尚未阐明;2. PRF 应用的最佳时间、频率和最适浓度;3. 体内 PRF 与 BMSCs 联合应用修复软骨缺损还需要进一步研究。本实验利用自体富血小板纤维蛋白来诱导骨髓间充质干细胞成软骨分化,以经典成软骨诱导作为对照组,经甲苯胺蓝和 II 型胶原免疫组化染色及 RT-PCR 检测软骨相关基因表达水平,证实 PRF 在体外能促进 BSMCs 向软骨细胞分化,为体外构建组织工程软骨提供了可参考的种子细胞诱导培养方法,下一步我们将研究 PRF 联合 BCMCs 体内修复关节软骨缺损,验证其体内成软骨的良好效果,为其临床广泛应用提供有益思路。

参考文献(References)

- [1] Steinert AF, Ghivizzani SC, Rethwilm A, et al. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage [J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(3): 213
- [2] Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, et al. Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 88(3): 379-391
- [3] Getgood A, Brooks R, Fortier L, et al. Articular cartilage tissue engineering: today's research, tomorrow's practice? [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2009, 91(5): 565-576
- [4] 张鹏,戴超. 关节软骨修复中的相关因子 [J]. *国际骨科学杂志*, 2008, 29(4):264-266
Zhang Peng, Dai Ke-rong. The relative factors in the repair of articular cartilage[J]. *Inter J Orthop*, 2008, 29(4): 264-266
- [5] Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2006, 101(3): e45-e50
- [6] Lundquist R, Holmstrom K, Clausen C, et al. Characteristics of an autologous leukocyte and platelet-rich fibrin patch intended for the treatment of recalcitrant wounds [J]. *Wound Repair Regen*, 2013, 21(1): 66-76
- [7] Da H, Jia SJ, Meng GL, et al. The impact of compact layer in biphasic scaffold on osteochondral tissue engineering [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54838
- [8] Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, et al. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors [J]. *Trends Biotechnol*, 2009, 27(5): 307-314
- [9] Xie X, Wang Y, Zhao C, et al. Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(29): 7008-7018
- [10] Diss A, Dohan DM, Mouhyi J, et al. Osteotome sinus floor elevation using Choukroun's platelet-rich fibrin as grafting material: a 1-year prospective pilot study with microthreaded implants [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2008, 105(5): 572-579
- [11] Neovius EB, Kratz G. Tissue engineering by cocultivating human elastic chondrocytes and keratinocytes [J]. *Tissue Eng*, 2003, 9(2): 365-369
- [12] Taguchi T, Saito H, Iwasashi M, et al. Development of a novel glue consisting of naturally-derived biomolecules: citric acid and human serum albumin[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2007, 7(3): 742-747
- [13] Haleem AM, Singergy AA, Sabry D, et al. The Clinical Use of Human Culture-Expanded Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted on Platelet-Rich Fibrin Glue in the Treatment of Articular Cartilage Defects: A Pilot Study and Preliminary Results[J]. *Cartilage*, 2010, 1(4): 253-261
- [14] Stafford GH, Bunn JR, Villar RN. Arthroscopic repair of delaminated acetabular articular cartilage using fibrin adhesive. Results at one to three years[J]. *Hip Int*, 2011, 21(6): 744-750
- [15] Naik B, Karunakar P, Jayadev M, et al. Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review[J]. *J Conserv Dent*, 2013, 16(4): 284-293
- [16] Bielecki T, Dohan ED. Leukocyte- and platelet-rich Plasma (L-PRP) /fibrin (L-PRF) in medicine past, present, future [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, 13(7): i-ii
- [17] Leah E. Osteoarthritis: TGF-beta overload at bones of cartilage degeneration[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2013, 9(7): 382
- [18] Balcom NT, Berg-Johansen B, Dills KJ, et al. In vitro articular cartilage growth with sequential application of IGF-1 and TGF-beta1 enhances volumetric growth and maintains compressive properties [J]. *J Biomech Eng*, 2012, 134(3): 31001
- [19] Wilson JJ, Rabago DP, Lee KS, et al. Platelet-rich plasma treatment for lateral epicondylitis: letter to the editor[J]. *Am J Sports Med*, 2013, 41(7): 33-35
- [20] Cleary MA, van Osch GJ, Brama PA, et al. FGF, TGFbeta and Wnt crosstalk: embryonic to in vitro cartilage development from mesenchymal stem cells [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013 Apr 11. doi: 10.1002/term.1744. [Epub ahead of print]
- [21] Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(5): 403-412
- [22] Su CY, Kuo YP, Tseng YH, et al. In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009, 108(1): 56-61
- [23] He L, Lin Y, Hu X, et al. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009, 108(5): 707-713
- [24] Naik B, Karunakar P, Jayadev M, et al. Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review [J]. *J Conserv Dent*, 2013, 16(4): 284-293
- [25] O'Connell SM. Safety issues associated with platelet-rich fibrin method[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2007, 103(5): 587, 587-593