

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.12.032

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220428.2156.010.html\(2022-04-29\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220428.2156.010.html(2022-04-29))

浓缩生长因子促进干细胞成骨分化的研究进展*

代酉丽 综述,蒋孝添,李丛华[△] 审校

(重庆医科大学附属口腔医院大学城医院门诊部 401331)

[摘要] 近年来骨组织工程受到了广泛关注,在具有骨诱导性的支架上添加多种生长因子,并和干细胞一起移植至骨缺损部位,以促进骨再生。浓缩生长因子(CGF)为第3代血小板浓缩物,其获取途径广泛,安全方便。它由植入大量血小板、白细胞、生长因子等的柔软疏松的纤维蛋白支架组成,并可以有控制地缓慢释放生长因子。大量研究报道,CGF有良好的生物相容性及骨诱导性,可以单独或与其他骨移植材料联合应用促进干细胞增殖及成骨分化。本文主要对CGF在干细胞成骨分化中的作用作一综述,以期为CGF的应用提供参考。

[关键词] 浓缩生长因子;干细胞;细胞增殖;成骨分化;骨再生;综述

[中图分类号] R329.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)12-2131-05

Advances in concentrated growth factors to promote osteogenic differentiation of stem cells*

DAI Youli,JIANG Xiaotian,LI Conghua[△]

(Department of Outpatient Clinic,University City Hospital,Affiliated Stomatological Hospital of Chongqing Medical University,Chongqing 401331,China)

[Abstract] In recent years, bone tissue engineering in which a variety of growth factors are added to the osteoinductive scaffold and transplanted to the bone defect site together with stem cells to promote bone regeneration, has attracted wide attention. Concentrated growth factor (CGF) is the third-generation platelet concentrate, which is widely available, safe and convenient. It consists of a soft and loose fibrin scaffold implanted with a large number of platelets, leukocytes, growth factors, etc, and can slowly release growth factors in a controlled manner. A large number of studies have reported that CGF has good biocompatibility and osteoinductivity, and can be used alone or in combination with other bone graft materials to promote stem cell proliferation and osteogenic differentiation. In this paper, the role of CGF in osteogenic differentiation of stem cells was reviewed, in order to provide a reference for the application of CGF.

[Key words] concentrated growth factor; stem cell; cell proliferation; osteogenic differentiation; osteoneogenesis; review

创伤、坏死、肿瘤、先天畸形等各种原因都可能导致大面积骨缺损和骨愈合失败,这些在人或动物的一生中不能完全愈合的缺陷称为临界骨缺损^[1]。临界骨缺损通常需要手术用自体骨移植或骨移植替代物重建。其中自体骨移植常需要额外手术,且供体有限;骨替代材料存在塑形性和成骨能力不足等缺点^[2]。而且,由于祖细胞数量不足,缺乏向缺损部位的迁移,无法分化为成骨细胞,在临界骨缺损的愈合过程中仍存在难题^[3]。因此,骨组织工程受到了广泛关注,其可通过添加多种生长因子的具有骨诱导性的支架,将干细胞运送至缺损部位以促进骨再生。

生长因子的释放是组织再生研究中具有挑战性

的问题,目前浓缩生长因子(concentrated growth factor, CGF)作为能够控制其释放的储蓄库,正受到许多研究者的关注。CGF作为第3代血小板浓缩物,柔软疏松的纤维蛋白支架内包埋了大量的血小板、白细胞和红细胞,含有大量生长因子,很多学者研究表明CGF可以单独或和其他骨移植材料联合应用促进干细胞增殖及成骨分化。在骨组织工程中,牙源性干细胞及骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)等常被用于研究。其中,牙源性干细胞是具有自我更新能力和多向分化潜力的间充质干细胞群体。从较早发育阶段的组织(如牙胚、牙囊、初生脱落的乳牙)或成人牙齿组织(如成

* 基金项目:重庆市自然科学基金项目(cstc2021jcyj-msxmX0159)。

作者简介:代酉丽(1995—),在读硕士研究生,主要从事牙周组织再生

工程研究。△ 通信作者,E-mail:liconghua@hospital.cqmu.edu.cn。

人牙髓、根尖乳头、牙周韧带和牙龈)中分离出神经嵴来源的干细胞,其可分化形成颅面软骨和骨,用于自体移植重建人颅面骨^[4]。

1 CGF的发展

1974年,含有多种自体生长因子和纤维蛋白支架的血小板浓缩物被发现^[5]。富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)作为第1代浓缩血小板已被用于各种医疗领域,但是近年来其使用受到限制,主要是由于添加凝血酶和氯化钙增强纤维聚合作用已被证明会引起交叉感染、免疫排斥等不良反应^[6]。为了克服这些问题,在不添加抗凝剂的情况下离心并分离出富血小板纤维蛋白(platelet-rich fibrin, PRF)^[7]。与PRP不同,PRF的纤维蛋白基质充当3D支架,允许生长因子缓慢释放,同时为细胞黏附、迁移和分化提供空间^[8]。2006年,有学者通过改变离心速度从PRF中分离出CGF,其可诱导纤维蛋白原转化为纤维蛋白,从而形成具有高抗张强度的基质,促进血小板破裂和生长因子释放^[9-10]。目前认为CGF在成分和临床适用性方面优于PRP和PRF。

2 CGF的主要成分及作用

CGF主要由多种生长因子、细胞、血小板及纤维网状支架组成。在CGF的制备中,血液样品通过固定程序进行差速离心处理分离出CGF凝胶层,由上层贫血小板层、中层血浆和下层红细胞层3层组成,CGF也具有3个部分,即最上面部分呈白色,最下面部分呈红色,中间部分为血沉层,呈棕黄色^[11]。电子显微镜扫描显示,CGF上部为3D网络,主要由纤维蛋白和一些类似天然纤维蛋白的小直径纤维蛋白分子组成,有利于细胞黏附;下部含有大量的细胞成分,包括血小板、白细胞和红细胞^[12],值得注意的是,其中还存在大量参与血管生成的分化细胞簇——CD34阳性细胞^[13]。通过纤溶激活包裹在CGF的纤维蛋白支架中的血小板可促进生长因子的持续释放,如转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF),上述生长因子已经被证实是组织工程中调节干细胞活性所必需的^[9,14]。TGF- β 1在大多数生理环境中是一种趋化和促有丝分裂因子,可促进间充质干细胞增殖和细胞外基质合成^[15]。PDGF刺激成纤维细胞、成骨细胞和间充质干细胞的增殖,还参与血管生成和胶原蛋白的生物合成^[16]。IGF调节多种细胞类型的增殖、迁移和分化,并诱导周围神经形成^[17]。VEGF是血管生成中内皮细胞增殖和迁移的关键调节因子,并在新生血管形

成过程中调节缺血环境中的血管通透性^[18]。BMPs是一类参与骨形成和发育的分泌型多功能蛋白^[19]。EGF在细胞分化、迁移和凋亡中发挥作用,并且在体外和体内均可作为有效的有丝分裂原^[20]。bFGF是一种具有促有丝分裂和血管生成活性的单链蛋白,可促进受损内皮细胞的修复和血管生成^[21]。

3 CGF对干细胞成骨分化的作用

3.1 CGF促进牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)增殖及成骨分化

YU等^[22]报道,将CGF与比格犬PDLSCs共培养发现,CGF能显著促进PDLSCs增殖,增强碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的活性、矿化结节的沉积能力和上调成骨相关基因的表达来促进其成骨分化,而且这种作用随CGF浓度增加而增强。贾婷婷^[23]将PDLSCs接种于CGF膜上培养,发现CGF膜也可显著促进PDLSCs增殖和成骨分化。QIAO等^[24]初步探讨了关于CGF促进hPDLSCs成骨分化的机制,发现CGF显著促进人PDLSCs(hPDLSCs)的增殖和ALP活性,且与重组人血小板衍生生长因子-AB(rhPDGF-AB)和重组人转化生长因子- β 1(rhTGF- β 1)的联合作用相比,其作用更强,Wnt/ β -catenin信号通路在早期参与了CGF诱导的细胞增殖和分化。而关于CGF对炎症环境下PDLSCs的作用,LI等^[25]报道在肿瘤坏死因子 α (TNF- α)诱导的炎症微环境下,CGF渗出液明显增强了hPDLSCs的增殖和成骨分化,CGF中所含的TGF- β 1通过上调Runx2转录因子表达减轻了TNF- α 对hPDLSCs成骨分化的抑制作用。而AGHAMOHAMADI等^[26]报道,CGF促进PDLSCs增殖无剂量依赖性,高浓度CGF显著抑制PDLSCs增殖,并认为由TGF- β 和蛋白水解酶介导。

3.2 CGF促进牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)增殖及成骨分化

牙本质-牙髓复合物对于牙齿的长期完整性和活力至关重要,但它容易受到外部因素的损伤。随着干细胞组织工程的发展,将牙源性干细胞与组织修复微环境相结合以促进牙本质-牙髓复合物再生的可能性增加。JIN等^[27]发现,CGF以剂量依赖的方式促进DPSCs增殖,高浓度CGF抑制DPSCs的内皮分化和成牙本质细胞分化,且高剂量CGF的负面作用可能与浓度增加时TGF- β 、白细胞介素(IL)-1 β 和IL-6过量有关。JUN等^[28]用CGF提取物处理人DPSCs(hDPSCs),发现CGF提取物显著促进hDPSCs增殖和迁移,且呈剂量依赖性。XU等^[29]的实验也表明,CGF以剂量依赖的方式促进暴露于脂多糖的DPSCs的增殖、迁移和分化,可能是由于CGF处理的DPSCs分泌TNF- α 和IL-8促进了DPSCs迁移。TIAN等^[30]研究发现,CGF以剂量依赖的方式促进DPSCs的增殖和迁移,CGF通过上调RUNX2转录因子增强DPSCs成牙或成骨分化,且骨形成蛋白2(BMP-2)/

Smad5/Runx2 信号通路与 CGF 介导的 DPSCs 矿化有关。LI 等^[31]研究了 CGF 渗出液 (CGFe) 和 TGF- β 1 的协同作用,结果表明 CGFe 和 TGF- β 1 增强了 hDPSCs 活力,并通过激活有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路促进 hDPSCs 的活力和成骨分化。

3.3 CGF 促进 BMSCs 增殖及成骨分化

BMSCs 是骨组织工程中常用的一种多能干细胞,能够多向分化。HONDA 等^[32]报道了 CGF 促进 BMSCs 的增殖及成骨分化,且这种作用呈剂量依赖性。CHEN 等^[33]进一步证实 CGF 联合 BMSCs 修复骨缺损具有独特的天然优势,研究结果表明 CGF 与 BMSCs 结合可以形成纤维蛋白支架,这种支架对成骨有强大的作用,同时还具有血管生成的辅助作用,而且 CGF 与 BMSCs 联合具有良好的骨诱导活性,是一种优秀的骨再生生物材料。近期,张月等^[34]实验结果表明,CGF 能有效促进 BMSCs 在矿化胶原材料上的黏附、增殖和成骨分化,其中 10% CGF 渗出液效果最显著,而且与矿化胶原材料联合应用可促进骨形成。

3.4 CGF 促进脂肪干细胞 (adipose derived pulp stem cells, ADSCs) 增殖及成骨分化

与其他来源的干细胞相比,ADSCs 具有供应丰富、制备简单、再生能力强等优点,正在成为组织工程中种子细胞的重要来源^[35-36]。马翔宇等^[37]探讨 CGF 对 ADSCs 成骨作用的影响,证实了比格犬 ADSCs 在体外矿化环境诱导下可出现骨向分化,CGF 可通过释放生长因子显著加强 ADSCs 的增殖及成骨效应。近来 HU 等^[38]探究了不同含量 CGF (0、5%、10%、20%) 对 ADSCs 增殖分化的影响,发现在体外促进 ADSCs 增殖和分化的最佳含量为 20%,将 CGF 与 ADSCs 相结合的复合物植入骨缺损处在大鼠体内显示出良好的成骨作用,证明 CGF/ADSCs 复合物可以促进大鼠颌面部骨缺损修复。

3.5 CGF 促进牙龈间充质干细胞 (gingiva-derived mesenchymal stem cells, GMSCs) 增殖及成骨分化

与 BMSCs 相比,GMSCs 来源于临床废弃物,且易获得、可自我修复,具有更高的增殖率。但就临床骨再生而言,GMSCs 的成骨分化能力较差。CHEN 等^[39]用不同含量 CGF 培养 GMSCs,实验结果显示 10% CGF 对 GMSCs 增殖的促进作用最为显著,且 CGF 通过调控牙本质基质蛋白 1 (DMP1)、牙本质涎磷蛋白 (DSPP)、BMP-2 和 RUNX2 的表达诱导 GMSCs 成骨分化。QI 等^[40]采用不同浓度的 CGF 处理 GMSCs,观察 CGF 对细胞增殖和迁移的影响,发现 CGF 培养的 GMSCs 细胞增殖能力和迁移能力明显增强。此外,CGF 提高了纤维连接蛋白 (FN)、I 型胶原蛋白 (Col-I)、VEGF 和血管生成素-1 (Ang-1) 的表达水平。CGF 的这些作用是由蛋白激酶 B (AKT)/Wnt 和 Yes 相关蛋白 (YAP) 通路介导,而 AKT 可能

在 Wnt/ β -catenin 和 YAP 通路的上游发挥作用。在体内模型中也显示 YAP 过表达。因此,CGF 具有促进牙龈再生的作用,而 YAP 转运至细胞核可能是其中的关键因素,这为牙龈再生提供了新的视角,进一步促进了 CGF 的临床应用。

4 小结及展望

CGF 可通过专业的设备、规范的程序从自体静脉血离心而得,来源丰富、制取方便快捷。相比一些外源性生长因子,CGF 排除了临床应用中可能存在的交叉感染、毒性和免疫原性等风险,具有良好的生物相容性及较高的经济性。CGF 柔软致密的纤维蛋白支架中包裹多种生长因子,纤维蛋白支架作为一种临时基质,有助于延长生长因子的释放时间。但 CGF 的生物活性不持久,在生物物理和生物化学环境中,生长因子的释放动力学将直接影响其生物活性模式。随着纤维蛋白支架降解,血小板团逐渐分解,生长因子缓慢释放到局部微环境中,延长生长因子的释放时间可能符合再生重建的长期过程。CGF 通过与其他生物材料结合,可以建立一个连续的药物传递系统,这可能有助于延长 CGF 的生物活性持续时间。而且 CGF 中生长因子的具体组成及含量至今还在探究中,已知的生长因子的作用途径也极其有限。基于 CGF 的再生治疗的关键是通过引入连续的药物传递系统来增加生长因子的数量和释放时间,因此,探究 CGF 中生长因子的组成和含量有利于支持其临床应用。

以上研究探讨了 CGF 对多种干细胞增殖及成骨分化的作用,然而仍有一些干细胞未进行相关实验,如牙囊干细胞、人脱落乳牙干细胞等,CGF 对这些干细胞的作用仍待进一步探究和验证,以选出最合适的干细胞,经过相关基因转染的干细胞也应在考虑范围内。目前 CGF 对干细胞的最佳作用浓度仍存在一定争议。大部分实验结果表明,CGF 促进干细胞增殖的作用呈现剂量依赖性,但也有部分研究显示在低浓度下 CGF 提取物对细胞增殖和分化的正向作用呈剂量依赖性,而高浓度 CGF 对细胞增殖和分化有抑制作用。分析原因可能与 CGF 中血小板计数及制备、储存等有关,还需要进一步探究。此外,近几年支架材料发展迅速,不同支架的运用可改善干细胞的附着,延长生长因子的释放时间并提高活性。因此也需要考虑将 CGF、干细胞与新型支架材料联合运用,以期发挥出 CGF 的最大生物活性优势。

参考文献

- [1] SPICER P P, KRETLOW J D, YOUNG S, et al. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect[J]. Nat Protoc, 2012, 7(10):1918-1929.
- [2] WM T, GHONEIM M M, SALAH O, et al. Au-

- tologous bone marrow concentrates and concentrated growth factors accelerate bone regeneration after enucleation of mandibular pathologic lesions[J]. *J Craniofac Surg*, 2018, 29(4):992-997.
- [3] ORYAN A, KAMALI A, MOSHIRI A, et al. Role of mesenchymal stem cells in bone regenerative medicine: what is the evidence? [J]. *Cells Tissues Organs*, 2017, 204(2):59-83.
- [4] 丁越, 张辉, 孙晓菊. 骨髓间充质干细胞促进皮肤创伤愈合及细胞因子在愈合过程表达研究[J]. *中国实用口腔科杂志*, 2015, 8(2):103-107.
- [5] LIU H Y, HUANG C F, LIN T C, et al. Delayed animal aging through the recovery of stem cell senescence by platelet rich plasma[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(37):9767-9776.
- [6] FRANCO D, FRANCO T, SCHETTINO A M, et al. Protocol for obtaining platelet-rich plasma (PRP), platelet-poor plasma (PPP), and thrombin for autologous use[J]. *Aesthetic Plast Surg*, 2012, 36(5):1254-1259.
- [7] DOHAN D M, CHOUKROUN J, DISS A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2006, 101(3):e37-44.
- [8] MOHANTY S, PATHAK H, DABAS J. Platelet rich fibrin: a new covering material for oral mucosal defects[J]. *J Oral Biol Craniofac Res*, 2014, 4(2):144-146.
- [9] 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)[J]. *Int J Implant Dent*, 2016, 2(1):19.
- [10] QIAO J, AN N, OUYANG X. Quantification of growth factors in different platelet concentrates [J]. *Platelets*, 2017, 28(8):774-778.
- [11] WATANABE T, ISOBE K, SUZUKI T, et al. An evaluation of the accuracy of the subtraction method used for determining platelet counts in advanced platelet-rich fibrin and concentrated growth factor preparations[J]. *Dent J (Basel)*, 2017, 5(1):7.
- [12] HONG S, LI L, CAI W, et al. The potential application of concentrated growth factor in regenerative endodontics[J]. *Int Endod J*, 2019, 52(5):646-655.
- [13] RODELLA L F, FAVERO G, BONINSEGNA R, et al. Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction[J]. *Microsc Res Tech*, 2011, 74(8):772-777.
- [14] TAKAHASHI A, TSUJINO T, YAMAGUCHI S, et al. Distribution of platelets, transforming growth factor- β 1, platelet-derived growth factor-BB, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in advanced platelet-rich fibrin and concentrated growth factor matrices[J]. *J Investig Clin Dent*, 2019, 10(4):e12458.
- [15] WU M, CHEN G, LI Y P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease[J]. *Bone Res*, 2016, 4:16009.
- [16] WU L W, CHEN W L, HUANG S M, et al. Platelet-derived growth factor-AA is a substantial factor in the ability of adipose-derived stem cells and endothelial progenitor cells to enhance wound healing[J]. *FASEB J*, 2019, 33(2):2388-2395.
- [17] TENG C F, JENG L B, SHYU W C. Role of insulin-like growth factor 1 receptor signaling in stem cell stemness and therapeutic efficacy[J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(9):1313-1319.
- [18] VAN GASTEL N, TORREKENS S, ROBERTS S J, et al. Engineering vascularized bone: osteogenic and proangiogenic potential of murine periosteal cells[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(11):2460-2471.
- [19] KATAGIRI T, WATABE T. Bone morphogenetic proteins[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(6):a021899.
- [20] BASAL O, ATAY T, CIRISI M, et al. Epidermal growth factor (EGF) promotes bone healing in surgically induced osteonecrosis of the femoral head (ONFH)[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2018, 18(4):352-360.
- [21] NOWWAROTE N, SAWANGMAKE C, PAVASANT P, et al. Review of the role of basic fibroblast growth factor in dental tissue-derived mesenchymal stem cells [J]. *Asian Biomed*, 2015, 9(3):271-283.
- [22] YU B, WANG Z. Effect of concentrated growth factors on beagle periodontal ligament stem

- cells in vitro[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(1): 235-242.
- [23] 贾婷婷. 浓缩生长因子对人牙周膜干细胞增殖及成骨分化能力的影响[D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [24] QIAO J, AN N. Effect of concentrated growth factors on function and Wnt3a expression of human periodontal ligament cells in vitro[J]. *Platelets*, 2017, 28(3): 281-286.
- [25] LI X, YANG H, ZHANG Z, et al. Concentrated growth factor exudate enhances the proliferation of human periodontal ligament cells in the presence of TNF- α [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(2): 943-950.
- [26] AGHAMOHAMADI Z, KADKHOZADEH M, TORSHABI M, et al. A compound of concentrated growth factor and periodontal ligament stem cell-derived conditioned medium[J]. *Tissue Cell*, 2020, 65: 101373.
- [27] JIN R, SONG G, CHAI J, et al. Effects of concentrated growth factor on proliferation, migration, and differentiation of human dental pulp stem cells in vitro[J]. *J Tissue Eng*, 2018, 9: 2041731418817505.
- [28] JUN H, LEI D, QIFANG Y, et al. Effects of concentrated growth factors on the angiogenic properties of dental pulp cells and endothelial cells: an in vitro study[J]. *Braz Oral Res*, 2018, 32: e48.
- [29] XU F, QIAO L, ZHAO Y, et al. The potential application of concentrated growth factor in pulp regeneration: an in vitro and in vivo study[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 134.
- [30] TIAN S, WANG J, DONG F, et al. Concentrated growth factor promotes dental pulp cells proliferation and mineralization and facilitates recovery of dental pulp tissue[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 10016-10028.
- [31] LI X, YANG H, ZHANG Y, et al. CGFe and TGF- β 1 enhance viability and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells through the MAPK pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(4): 1048.
- [32] HONDA H, TAMAI N, NAKA N, et al. Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in *Rattus norvegicus* calvaria defect model[J]. *J Artif Organs*, 2013, 16(3): 305-315.
- [33] 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[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5876.
- [34] 张月, 刘克达, 闫明, 等. 浓缩生长因子联合矿化胶原材料对 BMSCs 黏附、增殖和成骨分化的影响及体内成骨效应[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2021, 35(3): 295-302.
- [35] SHEYKHHASAN M, WONG J, SEIFALIAN A M. Human adipose-derived stem cells with great therapeutic potential[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2019, 14(7): 532-548.
- [36] WANG Z, LI Z, DAI T, et al. Addition of Adipose-Derived stem cells to mesenchymal stem cell sheets improves bone formation at an ectopic site[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2): 70.
- [37] 马翔宇, 丁俐丹, 唐世俊, 等. 自体浓缩生长因子对比格犬脂肪干细胞体外增殖及成骨向分化的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2018, 43(1): 1-6.
- [38] HU T, ZHANG H, YU W, et al. The combination of concentrated growth factor and Adipose-Derived stem cell sheet repairs skull defects in rats[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2021, 18(5): 905-913.
- [39] CHEN X, CHEN Y, HOU Y, et al. Modulation of proliferation and differentiation of gingiva-derived mesenchymal stem cells by concentrated growth factors: potential implications in tissue engineering for dental regeneration and repair[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(1): 37-46.
- [40] QI L, LIU L, HU Y, et al. Concentrated growth factor promotes gingival regeneration through the AKT/Wnt/ β -catenin and YAP signaling pathways[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 920-932.