

## 幹細胞併合血小板纖維蛋白應用於骨折之修補與再生(II)

林思緯、府城宏、郭宗甫 (國立台灣大學獸醫學系)

### (五)臨床應用

人體或動物體骨頭的再生能力有限，利用組織工程與幹細胞移植的概念，將細胞與細胞支架 (scaffold) 結合，先於體外培養出健康的MSC以後，再配合PRP/PRF特性使MSC和PRP/PRF有一個加成性的作用，並運用到骨頭缺損或斷裂的位置，因此我們接下來要講得在這方面的臨床應用

(I)第1篇為在2004年由Yoichi Yamada等人所做的研究，研究中證實了把PRP結合幹細胞可以增加骨頭生成速率跟提高骨頭再生量。研究對象為4隻混種成犬平均年齡為2歲，把他們的兩邊下顎的第一白齒及1 3 4前白齒拔除並用環鑽創造直徑10mm的缺陷，並把此缺陷分別做填充PRP、PRP和狗的MSC、PCBM(自體來源顆粒狀的海綿骨和骨髓)以及控制組(不填充任何東西)。並統計兩個月的癒合時間，之後再從外觀上、影像學、組織學和組織型態學上去評估骨頭修復的效果，而在這篇論文中的PCBM修補在這裡我們不加以討論。[25]

(1)材料：間葉幹細胞由狗的腸骨脊骨髓中抽取出，裡面的培養液、低葡萄糖的DMEM跟生長添加物由購買而得，先把細胞在37度且在潮濕大氣(包含95%空氣和5%二氧化碳)中培養，再把這些細胞再次放到另一個培養皿(密度為 $3.1 \times 10^3$ 細胞/平方公分)，間葉幹細胞分化藉由偵測鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性來偵測。約6天後培養液中的ALP活性劇烈增加，之後再把MSC胰蛋白酶化作為植入準備。PRP製備：50毫升全血加入10毫升的肝素(250毫升/IU)，第一次離心1100轉5分鐘，把上層黃色血漿拿出，剩下的部分再進行第二次離心2500轉5分鐘，之後只留下5毫升的上清液使血小板懸浮在裡面。之後把粉末狀牛的凝血酶溶解在10毫升10%的氯化鈣溶液中，之後把PRP3.5毫升跟間葉幹細胞及0.5毫升空氣混和並放到5毫升針筒，之後把500uL的牛凝血酶氯化鈣混和物放入另一根針筒，之後把兩根針筒連接起來，之後推拉針筒，在5-30秒之內就產生了可溶性的凝膠。[25]

(2)方法：每個植入位置分別在2, 4, 8周時切下直徑2mm大小，之後固定染色去做組織學根組織型態學分析[25]

(3)結果：外觀跟影像學分析顯示在Fig5, (A)由外觀下觀察骨頭再生，之中(a)此缺陷直徑為10mm(b)缺陷處的植入物，最左邊填入dMSC+PRP，中間填入PCBM，最右邊是控制組(c)8周時的情況可以看到填充PRP/MSC跟PCBM當填充物完全消失時，骨頭再生已經回復到正常骨頭level，而在控制組跟只用PRP仍然沒有很完全再生。(B)圖是從影象學上分析結果，分別為(a)一開始植入後及(b)2周時，控制組中骨頭幾乎沒有生成，而在PRP/dMSC跟PCBM中已有骨生成(c)4周時跟(d)8周時，顯示了控制組中的骨生成非常緩慢而在PRP/dMSC中較佳骨生成，另外在植入

物消失速率跟骨生成速率相同。組織學分析顯示在Fig6，由上而下分別是控制組、只用PRP跟PRP/MSC，分別在2, 4, 8周去觀察骨頭修復情形。在控制組跟只用PRP組中，皮質的連續性並沒有恢復同時骨頭中許多空腔被血管、纖維組織所侵入同時只有少量骨生成；而在PRP/MSC中可以發現在2周時空腔就有新骨生成，且在8周時就有豐富血管新生且已經有成熟骨的樣貌。[25]

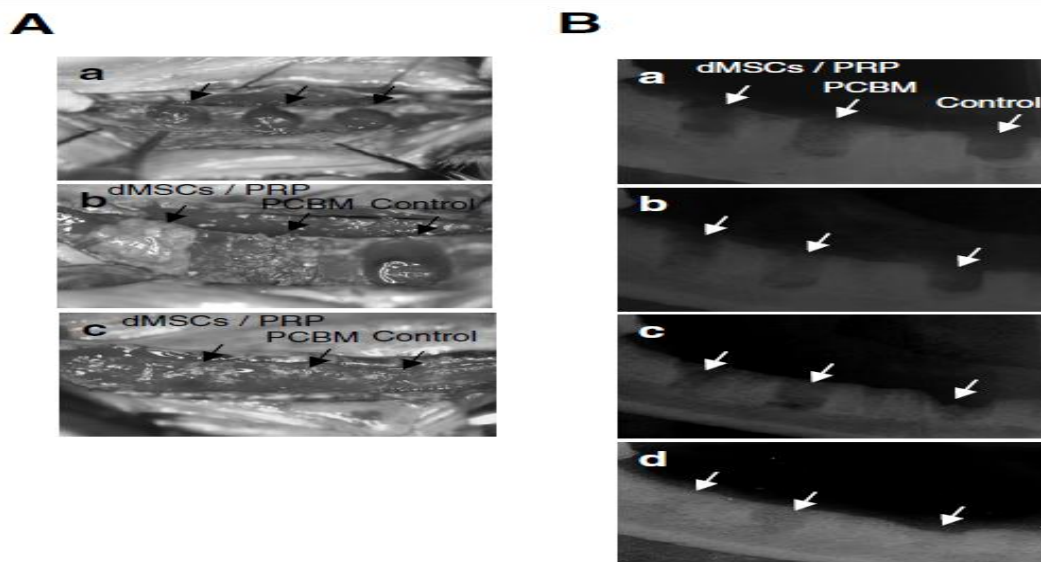


Fig 5.

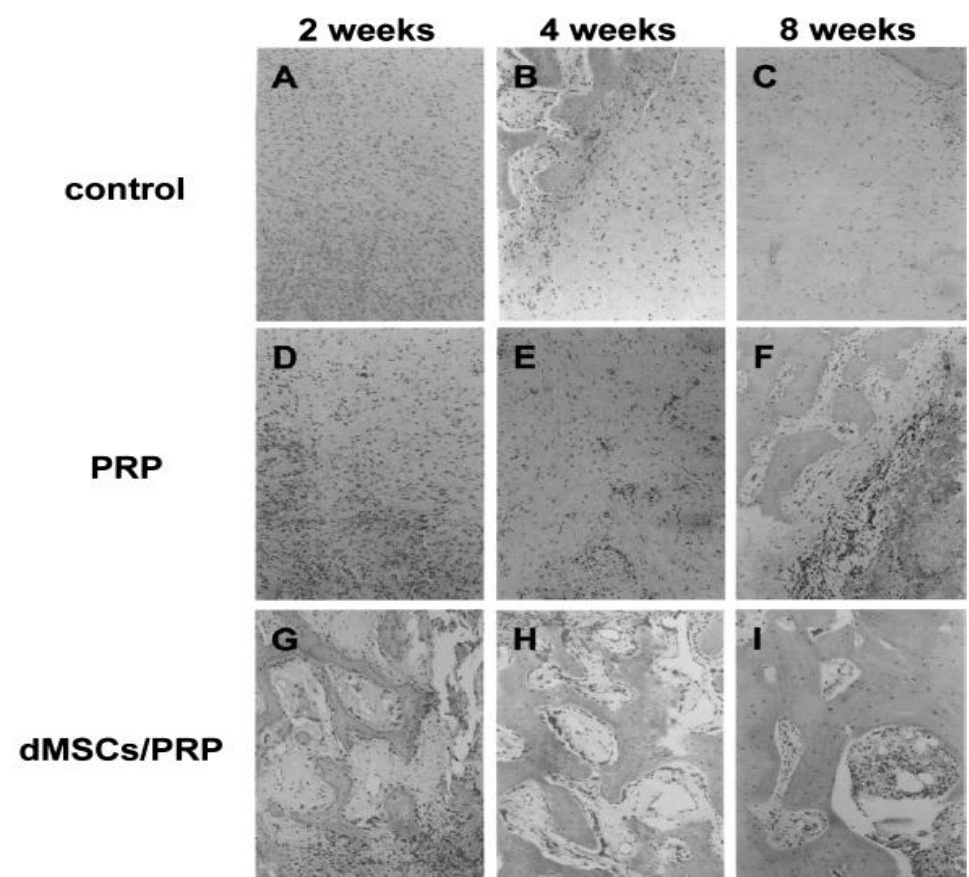


Fig 6.

接著再由組織型態學上去分析藉由影像測量皮質跟髓質骨的表面積，結果如 Table 1，PRP/MSC併用中其新骨生成比例明顯高於只用PRP和控制組[25]

	2 weeks (%)	4 weeks (%)	8 weeks (%)
Control	9.69 ± 4.97	14.9 ± 4.41	18.3 ± 4.84
PRP	8.01 ± 3.67 **	19.9 ± 5.13 *	29.2 ± 5.47 **
PRP/MSCs	29.2 ± 3.93 **	36.8 ± 4.79 *	67.3 ± 3.38 **

Table 1

(4)結論：在此篇研究中，把PRP跟dMSC結合使用發現了一個漸進性且完全的支架吸收，且其空間被成熟且重塑的骨頭所取代，此代表了一個真實的骨頭生成。而在控制組中此缺陷處被軟組織所包圍且沒有癒合過程。另外在只有PRP部分並沒有辦法誘導骨頭再生。因此認為PRP充當支架去誘導MSC附著、增值跟分化，進一步誘導骨頭生成。此支架也有血管化來提供骨再生時所需要的血管供應。也因此PRP跟MSC和用具有提供較快速跟有效的骨再生。[25]

(II)第2篇為郭宗甫老師和其團隊在2013年8月所發表，目的想評估人類牙髓幹細胞(human dental pulp stem cells, hDPSCs, 和骨隨間葉幹細胞相比有較高的骨再生成潛能，同時免疫調節能力會造成91.4%的T細胞抑制)跟不同種類可吸收骨粉合用在異種移植上面其骨頭再生的比較，選用12隻蘭嶼豬在育種到年齡3個月且25-30公斤(選用豬目的為跟人類代謝相似)，並在他們的下顎角前面用環鑽創造2個直徑6mm缺陷，分別填充3種不同骨粉，calcium sulfate dehydrate(CSD),  $\alpha$ -calcium sulfate hemihydrates/amorphous calcium phosphate( $\alpha$ -CSH/ACP)和 CSD/ $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP)跟控制組，另外再把這四組分成有加跟沒有加入人類牙髓幹細胞，手術後兩個月安樂，之後由組織學跟組織型態學上去比較骨頭生成效果。[16]

(1)材料：所有所需試劑皆由購買取得。純的 $\alpha$ -CSH製作為潮濕沉澱法利用0.1莫耳的硝酸鈣跟0.1莫耳的硫酸鉀分別溶解在50毫升3.5M的氯化鈣溶液中，兩者先加熱到95度之後混合並在大氣壓下培養2小時。ACP準備為把100毫升2.33M的sodium phosphate dibasic aqueous solution加入100毫升3.5M氯化鈣溶液，而骨粉中 $\alpha$ -CSH、 $\alpha$ -CSH/ACP (60/40)、 $\alpha$ -CSH/ $\beta$ -TCP(60/40)跟去離子水混合其比例為10:6，並在室溫下等一個晚上，之後再把他們壓碎並篩出分離420-840uM。[16]

(2)方法：選用12隻台灣蘭嶼豬，以下顎骨頭缺陷為模式。除了分成控制組

跟填入CSD、 $\alpha$ -CSH/ACP、CSD/ $\beta$ -TCP外，再分成把人類牙髓幹細胞植入這些移植物之中，方法為把300ul細胞懸浮液含 $2 \times 10^6$ 個人類牙髓幹細胞在合1毫升顆粒狀移植物混合控制濃度為 $2 \times 10^6$ 細胞/毫升。之後2個月後，檢體犧牲，並由組織學跟組織型態學去評估，採取骨頭樣本為圓柱狀(直徑6mm、長度8mm)，之後加入10%福馬林固定液、40%甲酸跟10%檸檬酸鈉去鈣質化、H&E染色。之後根據影像上去量化新骨生成量，缺線邊界跟空腔區域由視覺上觀察。[16]

(3)結果：組織學上結果在Fig7，此圖為8周時情形，由左至右分別為控制組跟別CSD、 $\alpha$ -CSH/ACP、CSD/ $\beta$ -TCP三種不同骨粉，上面沒有使用人類牙髓幹細胞，下面有人類牙髓使用幹細胞，沒有使用人類牙髓幹細胞中可以看見控制組跟CSD中以結締組織為主而在兒在 $\alpha$ -CSH/ACP、CSD/ $\beta$ -TCP具有明顯骨頭生成。而有使用人類牙髓幹細胞中可以看見即使在控制組中有一些新骨生成不過仍有不癒合空腔，在 $\alpha$ -CSH/ACP+hDPSCs對比於CSD/ $\beta$ -TCP+hDPSCs跟CSD+hDPSCs具有最少的不癒合空腔；組織型態學上結果在Table 2，結果顯示在只有移植物中，新骨生成比例在CSD、 $\alpha$ -CSH/ACP、CSD/ $\beta$ -TCP分別為 $33.9 \pm 9.9\%$ ， $61.7 \pm 2.3\%$ ，and  $44.5 \pm 2.9\%$ ， $\alpha$ -CSH/ACP具有最高骨生成比例，在控制組中跟CSD沒有明顯差異。在有加入人類牙髓使用幹細胞中，新骨生成比例在CSD+hDPSCs、 $\alpha$ -CSH/ACP+hDPSCs、CSD/ $\beta$ -TCP+hDPSCs分別為 $69.7 \pm 4.9\%$ ， $70.5 \pm 6.6\%$ ，and  $57.1 \pm 4.1\%$ ，在CSD+hDPSCs、CSD/ $\beta$ -TCP+hDPSCs中沒有明顯差異，在CSD/ $\beta$ -TCP+hDPSCs之中比例最低，有加入人類牙髓幹細胞中可以促進骨頭再生，特別是在CSD+hDPSCs組別中，因此混合hDPSCs確實可以提高骨再生。[16]

Fig7.

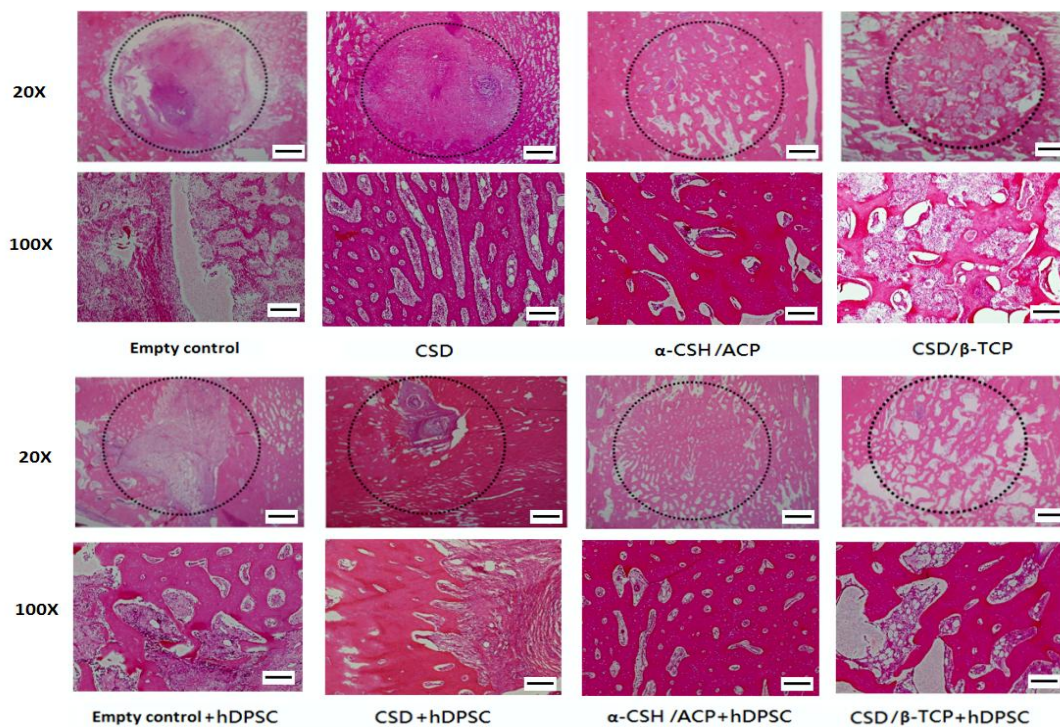


Table 2

	New bone formation (%)			
	without hDPSCs	CV (%)	with hDPSCs	CV (%)
Empty control	27.0±9.5 <sup>a</sup>	35.1	24.3±5.6 <sup>a</sup>	23.0
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	33.9±9.9 <sup>a</sup>	29.2	69.7±4.9 <sup>d</sup>	7.0
CaSO <sub>4</sub> ·0.5H <sub>2</sub> O/ACP	61.7±2.3 <sup>c</sup>	3.7	70.5±6.6 <sup>d</sup>	9.3
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O/-TCP	44.5±2.9 <sup>b</sup>	6.5	57.1±4.1 <sup>c</sup>	7.1

\*Different letters<sup>a, b, c, d</sup> denote a significant difference ( $p < 0.05$ )

\*\* Coefficient of Variation (CV) % = Standard Deviation / Mean x100

(4)結論：骨再生週期大約是3-6個月(Kawai, et al. 1997)，然而骨缺損的癒合時間仍然取決於缺損的大小、患者的年齡和身體狀況。一個理想的骨傳導骨移植可以在初始治療階段的細胞增殖中提供骨骼的支持，然後完全再吸收和被新骨形成取代。因此骨移植材料吸收速度也會決定骨頭生成，實驗中把CSD骨粉混和磷酸鈣骨粉去調整吸收速率。同時再把骨粉跟人類牙髓幹細胞混和可以提高骨生成的效率。[16]

(III)接下來要介紹PRF應用的，再介紹之前我們先來看看PRF和MSC為什麼要被一起使用在骨頭的再生：(1)在2010年 S. Verrier等人發現由高濃度的血小板釋放因子可以有效地誘導MSC中的骨母細胞分化和基質礦質化的效果，如此的特性使PRS在骨頭癒合的過程扮演著重要的角色(2)間葉幹細胞可以分化出多種不同型態的細胞，而這種分化機制的啟動必要發生在纖維蛋白和纖維蛋白原所形成暫時性的結痂基質上。這也是為何纖維蛋白會優先選擇做為這些細胞所需的支持的基質(3)PRF可形成一個網狀纖維蛋白膜對於MSC在其上面的血管新生作用有正向效果，因為PRF中的血管生長因子可以聚集MSC，進一步使MSC分化成血管細胞且加速血管新生，新生血管進一步吸引更多MSC遷移到此處而如此重複動作。基於上面的幾項特性，使得PRF和MSC的共同使用獲得更有效的骨頭再生能力，因此接著我們簡述2篇利用PRF在骨頭修復成功的論文。[17]

(I)第一篇為在2013年研究，此篇主要要評估把PRF加入biphasic calcium phosphate(BCP)用於手術創造的骨頭缺陷的效用。利用組織學跟組織型態學去觀察其在10, 20, 40天的骨頭修復效果。[2]

(1)材料：BCP為一種為商業上常用骨粉由較不溶的hydroxyapatite(HA)和較溶的 $\beta$ -tricalcium phosphate( $\beta$ -TCP)組成。此篇研究選用六隻公綿羊，平均年齡2-3歲，體重40-50公斤，用手術把兩側tibia用環鑽創造出4個寬度跟深度皆5mm的缺陷，Fig 8為右邊脛骨前面2個缺陷填充BCP/PRF(1:1)並蓋上PRF膜，後面兩個只填充PRF，Fig 9為左邊脛骨前面2個缺陷填充BCP，後面兩個做為控制組，之後骨膜再用縫合。術後對動物監控骨折和感染情形。而PRF準備為抽取頸靜脈血共80毫升，以400g離心12分鐘。[2]

(2)方法：用組織學及組織型態學去評估骨頭生成，所需檢體由10%福馬林固

定1周，再用50%甲酸和20%檸檬酸鈉去鈣化，之後再把他嵌入石蠟內再加以染色，切線位置在平行脛骨橫軸約4mm距離，再用一些統計方法(Kruskal-Wallistest)去計算新骨生成比例。[2]

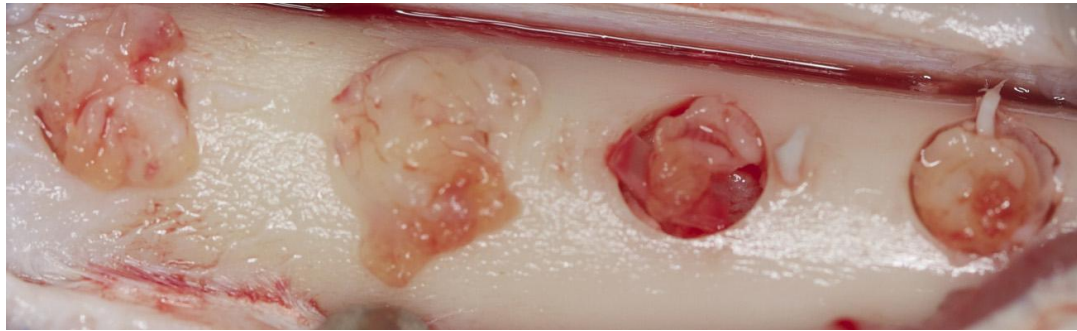


Fig 8.

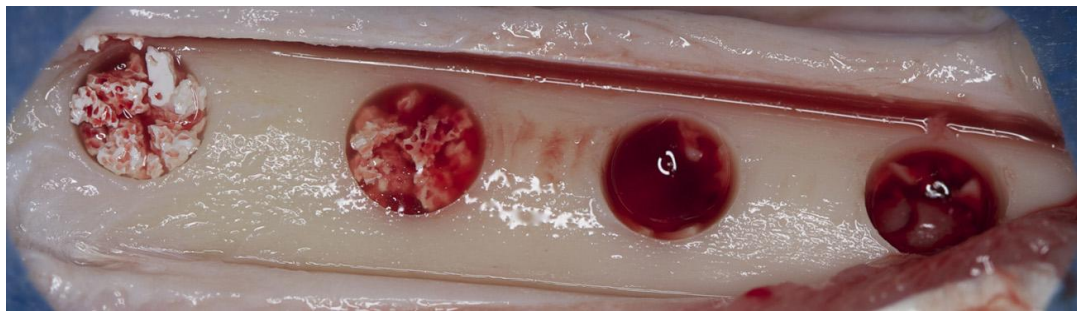


Fig 9.

(3)結果：由Fig10至Fig13為組織病理切片的結果，分別呈現出10, 20, 40天的情形，Fig10為PRF+BCP，Fig11為PRF，Fig12為BCP，Fig13為控制組。一般在修補的過程中會先有纖維組織的生成，所以可以見到20跟40天中在所有動物皆有原始間葉幹細胞圍繞著骨小樑跟移植物，之後這些增生的纖維組織會被新的骨頭組織所取代，因此在40天時纖維組織慢慢減少。可以看見在PRF跟控制組中在10天時已經有纖維組織生成，而在PRF跟PRF/BCP組別中顯示新骨組織圍繞著形成的纖維組織，同時在40天時這些骨頭組織已經有皮質骨外貌。[2]

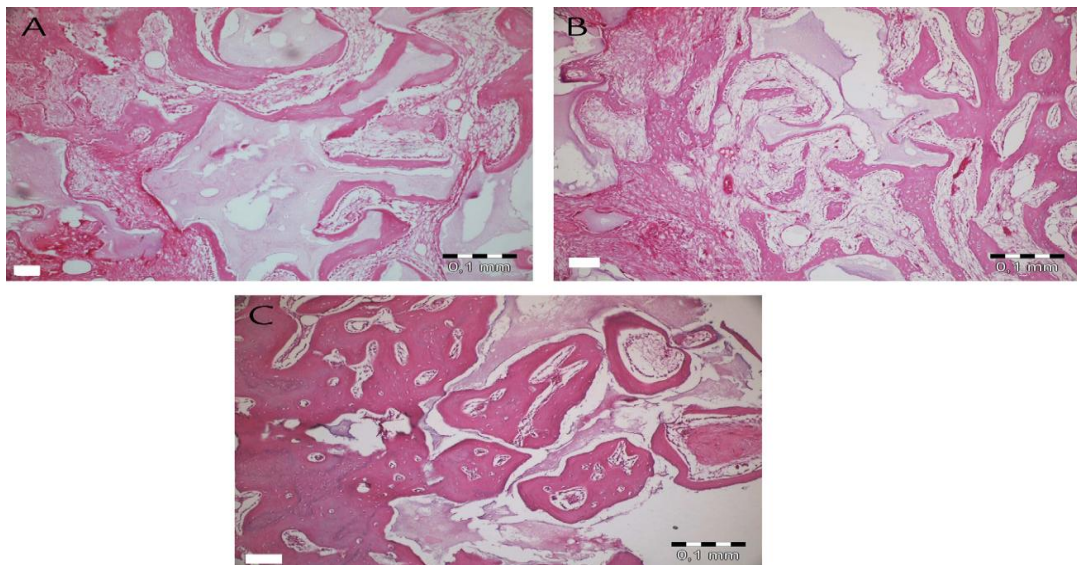


Fig 10.

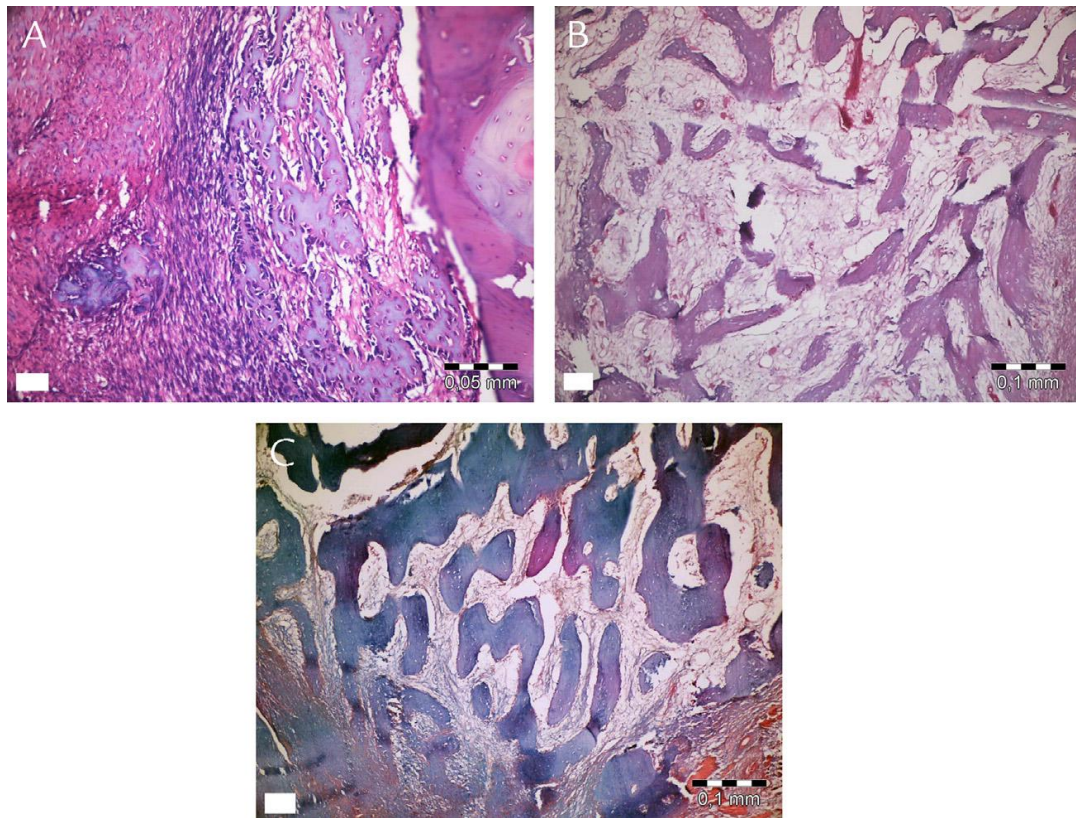


Fig 11.

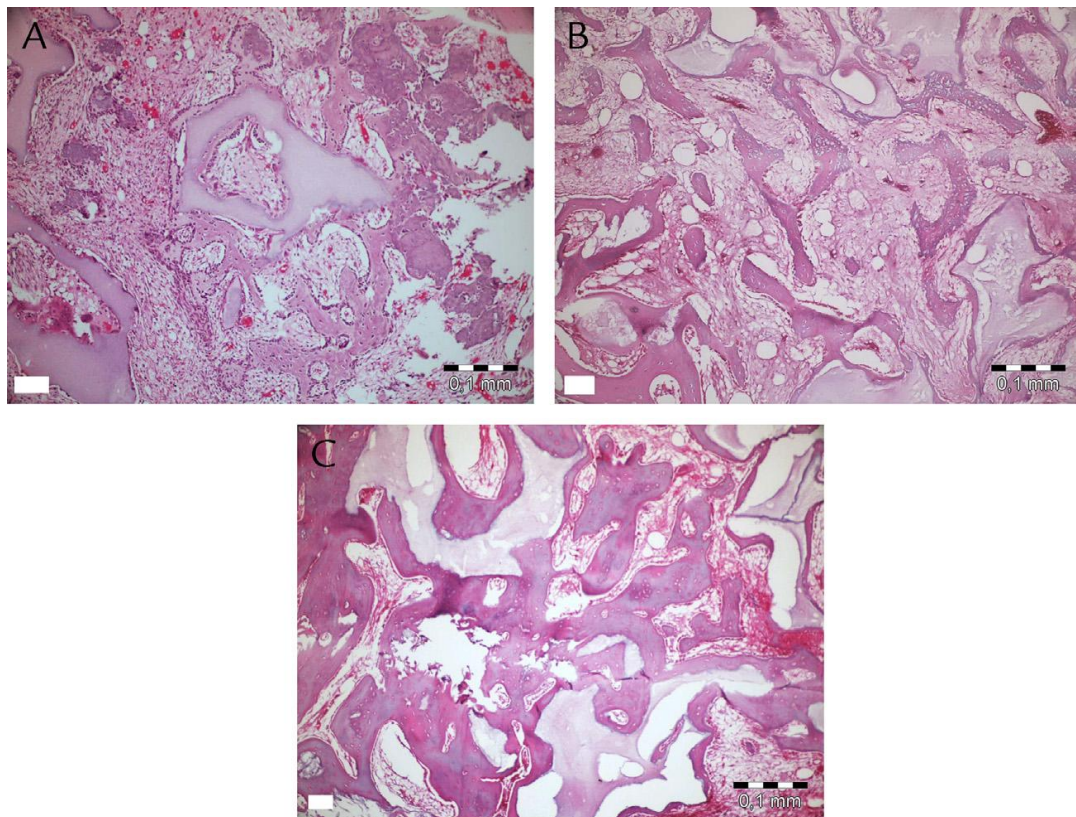


Fig 12.

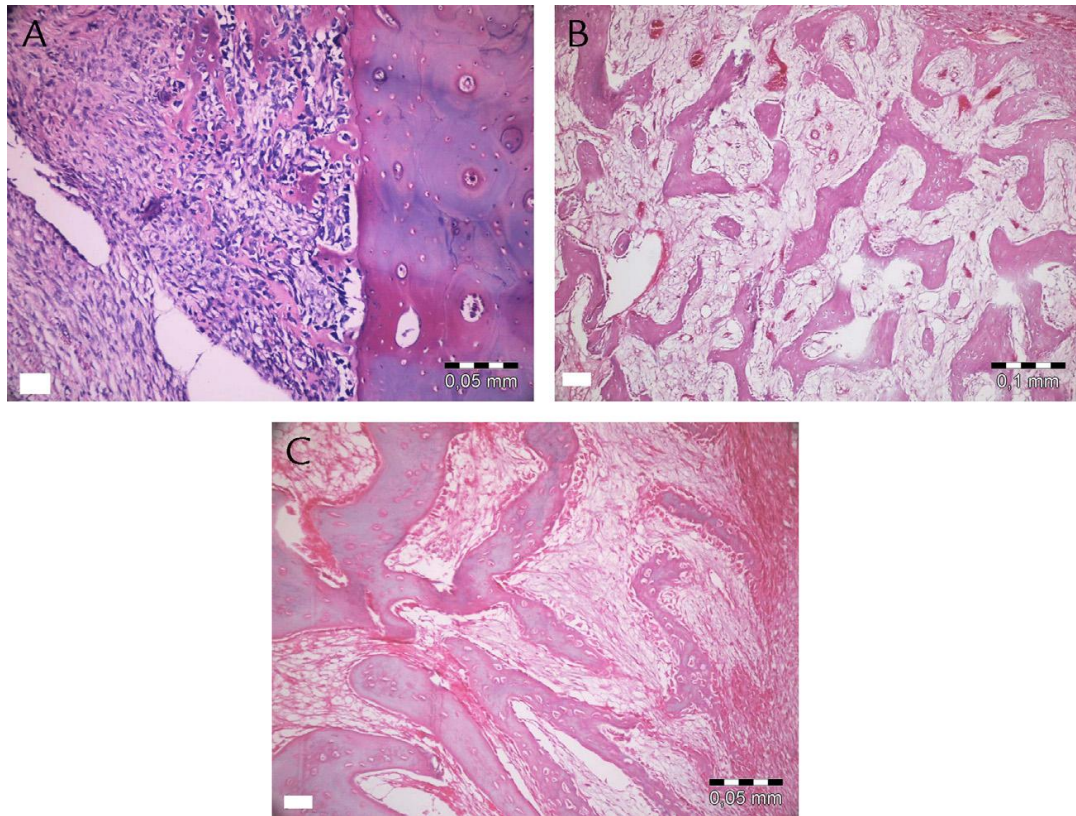


Fig 13.

接著用統計方法計算出各個組別新骨生成比例，結果如Table3，在第10天時，空的缺陷其骨生成比例最低，明顯低於PRF跟PRF+BCP，不過跟BCP沒有統計上差異，PRF跟BCP兩者新骨生成比例接近，而在PRF+BCP中明顯高於PRF跟BCP；在20天時PRF+BCP新骨生成比例最高，在其它3個組別中比例接近，PRF跟BCP兩者沒有統計上差異；第40天時，PRF+BCP跟BCP中骨生成比例幾乎達到50%，且兩者之間明有統計上差異，且PRF+BCP明顯高於空缺陷跟PRF，而空缺陷跟PRF沒有統計上差異，經過此分析可以見到PRF+BCP有最高的新骨生成比例。[2]

New bone formation ratios in each group at 10, 20, and 40 days. Data are mean (SD).

Killing day	Empty defect	PRF	BCP	PRF+BCP
10 days	3.4 (0.7)	7.4 (0.7)	7.2 (1.6)	11.4 (0.7)
20 days	24.9 (0.8)	29.5 (1.6)	29.6 (1.7)	42.2 (0.9)
40 days	39.7 (3.1)	38.9 (4.9)	49.1 (3.1)	54.9 (0.8)

BCP, biphasic calcium phosphate; PRF, platelet-rich fibrin.

Table3

(4)結論：PRF在近年的研究中證實具有加速且改善骨頭癒合過程，此篇研究的結果也顯示了PRF+BCP在缺陷處的骨頭修補確實高於只用BCP、PRF跟控制組。不管是自體來源的或是異體或異種來源的骨取代物皆有其優缺點，因此利用合成



的骨取代物變成了另一種新的選擇，像是BCP就可以提供生物相容性、骨傳導特性同時可以避免2次性手術位置。同時此次研究中發現在10跟20天中PRF+BCP在缺陷處的骨頭修補確實高於其他組別，不過在40天時具有相似結果，因此證實PRF具有有效的早期癒合階段。[2]

另外由長庚紀念醫院在2011年以狗為研究對象，把狗的雙側的下顎角創造缺陷並分別加入不同材料做修補，把自體來源的PRF加上骨誘導的MSC並配合上MEDPOR做為引導組織再生中具有潛在的骨頭修復效果。[17]

除了上述介紹的一些用於骨頭缺陷修補以外，PRP跟PRF在臨床上使用範圍很廣，Table 4中整理了一些其在其他方面應用[20]

PRP	PRF
顎竇增高術(sinus lift):可以加速治癒過程跟減少治癒時間	口腔應用: furcation defect、硬顎傷口修補、拔牙後的囊袋保留等等
齒脊增高(Ridge augmentation)	阿基里斯腱修補
囊袋保留去維持齒槽的高度	Diminution of deep nasolabial folds
骨內或骨頭缺損	顏面整形手術
下顎重建手術	嚴重不癒合下肢潰瘍修補
軟組織程序: 牙齦移植、表皮下移植	關節軟骨缺陷修補
不癒合骨折	
脛骨或腓骨的distraction osteogenesis	
Spinal fusion	
足部跟腳踝手術	
Total knee arthroplasty	

#### (六)結論

最後是我們的結論，從這幾年在世界各地的研究已經慢慢證實PRF在骨頭修補中扮演的角色和其實際的效果。PRF作為一個第二代血小板濃縮物質，擁有比PRP更好的生物學特性，在臨床上PRF顯著優於PRP。PRF與MSC結合運用在骨再生確實有加成效果。

在未來的展望上，由於PRF和MSC在長骨的應用上並不多，在這方面還需要不同的研究對象來證實它們效用。

#### 參考文獻

1. Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, Baldini N, Cenni E, Gomezbarrena E, Granchi D, Kassem M, Kontinen YT, Mustafa K, Pioletti DP. Bone regeneration and stem cells, Regenerative Medicine Review Series, November 2, 2010.
2. Bölükbaşı N, Yeniyo1 S, Tekkesin MS, Altunatmaz K. The Use of Platelet-Rich Fibrin in Combination With Biphasic Calcium Phosphate in the Treatment of Bone Defects: A Histologic and Histomorphometric Study, 15–21, 2013.
3. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL,

- DohanAJ, Mouhyi j, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF):A second-generation platelet concentrate, Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*101 :E56–60, 2006.
4. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, DohanAJ, Mouhyi j, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*101 :299–303, 2006.
  5. Calori GM, Mazza E, Colombo M, and Ripamonti C, The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? *Injury*, 42: 2, S56–S63, 2011.
  6. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, DohanAJ, Mouhyi j, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate, Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 101 :E37–44, 2006.
  7. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, DohanAJ, Mouhyi j, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate, Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 101 :E45–50, 2006
  8. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, DohanAJ, Mouhyi j, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate, Part III: Leucocytes activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*101 :E51–5, 2006.
  9. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, DohanAJ, Mouhyi j, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part3: Leucoeyteactivation: a new feature for platelet concentrates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101(3):e51-e55, 2006.
  10. Hak DJ. The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma, *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 15: 9, 525–536, 2007.
  11. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. 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. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 108(5):707-113, 2009.
  12. Halfön S, Abramov N, Grinblat B, Ginis I. Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem Cells Dev*; 20(1): 53-66, 2011
  13. José AA, Silvia Cl, Pedro JP, José Ma LP, Plácido ZN, Enrique G, Manuel M, María CA and José B. Skeletal Regeneration by Mesenchymal Stem Cells: What Else?, *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*, 2011
  14. Khiste SV, Tari RN, Platelet-Rich Fibrin as a Biofuel for Tissue Regeneration, Department of Periodontology, Tatyasaheb Kore Dental College and Research Centre, New Pargaon, Kolhapur, Maharashtra 416137, India, May 2013.
  15. Kanthan SR, Kavitha G, Addi S, Choon DSK, Kamarul T. Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-united critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models, *Injury*;42: 8, 782–789, 2011.
  16. Kuo TF, Lee SY, Wu HD, Yang JC, Poma M. In vivo swine study for xeno-grafts of calcium sulfate based bone grafts with human dental pulp stem cells (hDPSCs), National Taiwan University, August 2013.
  17. Liao HT, Chen CT, Chen CH, Chen JP. Combination of guided osteogenesis

- with autologous platelet-rich fibrin glue and mesenchymal stem cell for mandibular reconstruction, Chang Gung Memorial Hospitals, Chang Gung University College of Medicine, Taipei, Taiwan, 70(1):228-37, January 2011.
18. Mohamadreza BE, Faezeh F. Mesenchymal Stem Cell-Based Bone Engineering for Bone Regeneration, *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*, 2011.
  19. Nather A, Wong KL, David V, Pereira BP. Allografts with autogenous platelet-rich plasma for tibial defect reconstruction: a rabbit study, *Journal of Orthopaedic Surgery*, Department of Orthopaedic Surgery, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore, 2012.
  20. Naik B, Karunakar P, Jayadev M, Marshal V R. Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review. *J Conserv Dent*;16:284-93, 2013.
  21. Qian H, Le Blanc K, Sigvardsson M. Primary Mesenchymal Stem and Progenitor Cells from Bone Marrow Lack Expression of CD44 Protein, *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, Linkoping University, Sweden, 2012.
  22. Simman R, Hoffmann A, et al. Role of Platelet-Rich Plasma in Acceleration of Bone Fracture Healing, *Annals of Plastic Surgery • Injury*; 61; 3, September 2008.
  23. Verrier S, Meury TR, Kupcsik L, Heini P, Stoll T, Alini M. Platelet-Released Supernatant Induces Osteoblastic Differentiation of Human Mesenchymal stem cells: Potential Role of BMP-2. *European Cells and Materials*, 20:403-414, 2010.
  24. Vernon L, Kaplan L and Huang CYC (2012). Stem Cell Based Bone Tissue Engineering, *Bone Regeneration*, 2012.
  25. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata KI, Nagasaka T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Engineering*. 10(5-6):955-964, 2004.
  26. Zimmermann G, Moghaddam A, Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes, *Injury*; 42: 2, S16-S21, 2011.
  27. Zhang N, Wu YP, Qian SJ, Teng C, Chen S, Li H. Research Progress in the Mechanism of Effect of PRP in Bone Deficiency Healing. *The Scientific World Journal*, 7, 2013.