

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2019.08.003

· 基础研究 ·

富血小板纤维蛋白提取液对牙龈成纤维细胞增殖活性的影响

何家林^{1,2}, 徐燕¹, 谢贤哲^{1,2}, 王腾飞¹, 霍冬梅¹

1. 安徽医科大学附属口腔医院牙周黏膜科, 安徽合肥(230032); 2. 安徽安科生物工程(集团)股份有限公司, 安徽合肥(230032)

【摘要】 目的 研究富血小板纤维蛋白提取液(platelet-rich fibrin extract, PRFe)及其释放的血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)对牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblasts, HGFs)增殖活性的影响,为其应用于辅助促进牙龈软组织增量提供实验依据。方法 通过组织块培养法分离培养牙龈成纤维细胞,将收集的富血小板纤维蛋白(platelet-rich fibrin, PRF)转化为PRFe,电镜观察PRF三维结构并通过ELISA定量测定PRF中PDGF含量,并将PRFe配比为2.5%PRFe、5%PRFe、7.5%PRFe、10%PRFe、12.5%PRFe、15%PRFe,通过CCK8法检测不同浓度PRFe对牙龈成纤维细胞增殖活性的影响,确定最佳PRFe浓度后,流式细胞周期实验检测PRFe对细胞增殖周期的影响,并通过中和其释放的PDGF,观察PDGF对牙龈成纤维细胞增殖活性的影响。结果 PRF为三维网状结构,其间含有大量的生长因子,其中PDGF释放在第7天达到峰值;不同浓度PRFe对HGFs增殖活性结果显示,HGFs对PRFe呈浓度依赖性,但在5%PRFe浓度时效果最佳($P < 0.05$),其后浓度增加对HGFs增殖影响差异无统计学差异($P > 0.05$);流式细胞周期实验结果表明,5%PRFe可以刺激牙龈成纤维细胞S期分裂增殖;而PDGF中和实验结果表明,中和部分PDGF对牙龈成纤维细胞的增殖呈抑制作用。结论 5%浓度的PRFe体外促进牙龈成纤维细胞的效果最佳,PRF所释放的PDGF在促进牙龈成纤维细胞的增殖中起着重要作用。

【关键词】 富血小板纤维蛋白提取液; 血小板衍生生长因子; 牙龈成纤维细胞; 细胞增殖; 牙龈; 软组织增量

【中图分类号】 R783.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)08-0490-06

【引用著录格式】 何家林,徐燕,谢贤哲,等.富血小板纤维蛋白提取液对牙龈成纤维细胞增殖活性的影响[J].口腔疾病防治,2019,27(8):490-495.

Effect of platelet-rich fibrin extract on the proliferation of gingival fibroblasts HE Jialin^{1,2}, XU Yan¹, XIE Xianzhe^{1,2}, WANG Tengfei¹, HUO Dongmei¹. 1. Department of Periodontology, Affiliated Stomatology Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. Anke Bioengineering Limited Company, Hefei 230032, China
Corresponding author: XU Yan, Email: 173236344@qq.com, Tel: 86-17775388792

【Abstract】 Objective To study the effects of platelet-rich fibrin extract (PRFe) and platelet-derived growth factor (PDGF) released from PRFe on the proliferation of human gingival fibroblasts (HGFs) and to provide an experimental basis for its application in promoting gingival soft tissue increment. **Methods** Platelet-rich fibrin (PRF) was transformed into PRFe by tissue culture. The three-dimensional structure of PRF was observed by electron microscopy, and the content of PDGF in PRF was quantitatively determined by ELISA. The ratios of PRFe examined were 2.5% PRFe, 5% PRFe, 7.5% PRFe, 10% PRFe, 12.5% PRFe and 15% PRFe. Gingival fibrosis was detected by the CCK-8 method. After determining the optimal concentration of PRFe, flow cytometry was used to detect the effect of PRFe on the proliferation cycle of human gingival fibroblasts, and the effect of PDGF on the proliferative activity of gingival fibroblasts was

【收稿日期】 2018-12-27; **【修回日期】** 2019-04-13

【基金项目】 安徽省教育厅自然科学重大项目(KD2017ZD17);安医大安科生物校企合作项目(K2015011)

【作者简介】 何家林, 医师, 硕士研究生在读, Email: 785358788@qq.com

【通信作者】 徐燕, 主任医师, 博士, Email: 173236344@qq.com, Tel: 86-17775388792

observed by neutralizing the release of PDGF. **Results** PRF is a three-dimensional reticular structure that contains a large number of growth factors. PDGF release peaked on the 7th day. The proliferative activity of HGFs cultured with different concentrations of PRFe was concentration-dependent, but the effect was optimal at 5% PRFe ($P < 0.05$). There were no significant differences in the effect of subsequent concentration increases on the proliferation of HGFs ($P > 0.05$). The flow cytometry results showed that 5% PRFe could significantly stimulate the S-phase division and proliferation of gingival fibroblasts, while the PDGF neutralization test showed that the proliferation of gingival fibroblasts was significantly inhibited by the neutralization of PDGF. **Conclusion** Overall 5% PRFe had the best effect on promoting gingival fibroblast proliferation in vitro. PDGF released from PRF plays an important role in promoting the proliferation of gingival fibroblasts.

【Key words】 platelet - rich Fibrin extract; PDGF growth factor; gingival fibroblasts; cell proliferation; gums; soft tissue increment

J Prev Treat Stomatol Dis, 2019, 27(8): 490-495.

薄扇型牙龈生物型易形成牙龈退缩(gingival recession, GR),为治疗因牙龈退缩而导致的各种临床症状,同时改善牙龈美学,通过牙周整形手术来治疗牙龈退缩正逐渐成为学者们研究的热点^[1],而根据国内外学者研究,富血小板纤维蛋白(platelet-rich Fibrin, PRF)不仅富含大量生长因子,还有多种抗菌肽成分^[2],它有助于组织愈合且具有一定的抗炎作用。研究表明PRF能够缩短牙龈软组织愈合的时间,改善种植义齿软组织美学^[3],提高牙龈生成质量及厚度^[4],在牙周再生手术^[5]包括膜龈手术中具有积极作用^[6]。

尽管关于PRF对牙龈软组织愈合的临床研究已有报道,但关于PRF中释放的生长因子与牙龈软组织愈合的关系尚不清楚。本研究的主要目的是将PRF凝胶转变为PRF提取液(platelet-rich fibrin extract, PRFe),研究PRFe及其释放的血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)对牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblasts, HGFs)增殖的影响,为其应用于促进牙龈软组织增量提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和材料

主要试剂和仪器:DMEM(Hyclone公司,美国);胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)(Gibco,美国);鼠抗人波形蛋白Vimentin抗体和鼠抗人角蛋白Cytokeratin抗体(Santa,美国);Anti-PDGF抗体(Santa,美国);浓缩型DAB试剂盒(上海生工生物);CCK8(同仁,日本);荧光倒置显微镜(ZEISS,德国);JJT-900超净台;细胞培养箱(Thermo,美国);平底6孔培养板、平底12孔培养板、平底96孔

培养板(Corning,美国);扫描电镜(Hitachi,日本)。

1.2 牙龈成纤维细胞的分离培养和鉴定

1.2.1 样本收集 收集2017年11月—2018年06月就诊于安徽医科大学附属口腔医院18~35岁患者,因垂直阻生第三磨牙切龈导萌需而切取的牙龈组织,所纳入个体均无系统性疾病。切取冠周牙龈组织,立即置于4℃含抗生素的高糖培养液中,志愿者术前均签署知情同意书,本研究获得安徽医科大学伦理委员会批准同意。

1.2.2 牙龈成纤维细胞分离培养 将取得的牙龈组织,于超净工作台中用含双抗(青霉素100 U/mL,链霉素100 ug/mL)的PBS缓冲液反复冲洗3次以上,去净腐质及血污等。用眼科剪将去上皮组织块剪成约1 mm³大小,置于6孔板中,用20×20 mm盖玻片粘少许凡士林盖住组织块,加入10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养液2 mL。将6孔板置于37℃、5% CO₂饱和湿度下的恒温培养箱中培养,每3 d更换培养基一次,当显微镜观察原代细胞接近融合时即可传代培养。

1.2.3 人牙龈成纤维细胞的传代培养 第一次传代:弃去原培养基,加入PBS缓冲液冲洗掉表面的死细胞后,弃去液体。然后加入2.5%胰蛋白酶1 mL,消化约2~4 min,加入含10%胎牛血清的DMEM培养液,终止消化。然后反复吹打形成细胞悬液。置于1 000 rpm下离心10 min,弃上清液。在离心管中加入含有10%胎牛血清的DMEM培养液再次吹打均匀,吸取悬液于另外的无菌培养皿中,静置20 min,在倒置显微镜下观察到部分细胞贴壁,稍加摇晃不浮动时,将细胞悬液移入另一皿中,继续静置20 min,弃去上清液,然后在两个培养皿中加入2 mL含有胎牛血清的DMEM培养液,每3 d更

换一次。其后的传代不再静置 20 min,将悬液直接 1:3 比例接种于另外的无菌培养皿中。

1.2.4 形态学观察 倒置显微镜下观察原代细胞及传代细胞的形态。

1.2.5 免疫荧光细胞化学鉴定 当细胞传至第三代时,将无菌细胞爬片置于 24 孔培养板中,将细胞以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 浓度接种于孔内,当细胞长满约 70% 时候,进行免疫荧光组化染色操作:首先使用 PBS 反复冲洗后,4% 多聚甲醛室温固定 30 min,30% H_2O_2 和纯甲醇 1:50 混合,室温浸泡 30 min,蒸馏水清洗数次,再滴加 5% BSA 封闭液,室温封闭 20 min,吸去多余液体后不清洗。滴加 1:300 稀释的一抗,4 °C 冰箱过夜,PBS 洗 3 次 2 min,滴加荧光生物素化山羊抗小鼠 IgG,(20~37) °C 20 min,PBS 洗 2 min,3 次。滴加试剂 SABC,(20~37) °C 20 min,PBS 洗 5 min,3 次,激光共聚焦显微镜观察。角蛋白染色步骤除一抗不同外,染色步骤同波形蛋白染色。

1.3 富血小板纤维蛋白的制备,观察及其释放 PDGF 的检测

1.3.1 富血小板纤维蛋白及其渗液液的制备 于本课题组在读研究生中选取 10 名志愿者(女 5 名,男 5 名,年龄 22~30 岁),纳入标准:体重 50 kg 以上,无系统性疾病或传染性疾病史,无药物过敏史,近期末使用过任何药物。本研究需要从每名志愿者抽取自体静脉血,抽血前志愿者了解用途,并签署知情同意书。

① PRF 制备流程:采用一次性不凝的真空采血管每次抽取志愿者 5 mL 静脉血,之后立即将收集的静脉血放入离心机中,以 2 700 rpm/min 离心 12 min,可见采血管中收集的静脉血分为 3 层。上层为浅棕黄色的血浆层,中层淡黄色半透明的 PRF 凝胶层,下层为红细胞层。

② PRFe 制备流程:在超净工作台面将采血管上层的血浆层弃去,使用剪刀分离中间层纤维蛋白凝块和下层底部的红血细胞层,然后将 PRF 凝块置于无菌离心管中,-80 °C 冰冻 1 h,4 °C 解冻 230 g 离心 10 min,取上清液即为 PRFe。

1.3.2 富血小板纤维蛋白扫描电镜及其释放 PDGF 的 ELISA 检测 随机选择四管 PRF 用于生长因子测定,将 PRF 管置于摇床(36.5 °C,100 r/min)分别于第 1 小时和第 1、3、5、7、9 和 11 天收集 PRF 渗液,并将所有收集的渗液立即以 1 000 g 离心 10 min 使任何残留血细胞沉淀,并将上清液放

在 -80 °C 下冷冻,然后使用 ELISA 测定各时间点渗液中 PDGF-AB 的含量。

将一个 PRF 凝块修剪到合适的大小,并在磷酸盐缓冲液中漂洗 3 次,然后在 4 °C、2.5% 戊二醛中固定 1~2 h。随后,将凝块在磷酸盐缓冲液中漂洗 3 次以除去残留的戊二醛,然后经乙醇脱水。最后,通过凝胶的临界点干燥,金/钼溅射镀膜,用扫描电子显微镜检测。

1.4 PRFe 对牙龈成纤维细胞增殖的影响

1.4.1 最佳 PRFe 浓度的确定 收获 P4 代 HGFs,分别重悬于 DMEM、DMEM+2.5% PRFe、DMEM+5% PRFe、DMEM+7.5% PRFe、DMEM+10% PRFe、DMEM+12.5% PRFe、DMEM+15% PRFe 的培养液中,悬液浓度调整为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 后接种于 96 孔板中,每孔 100 μL 细胞悬液,一共 3 块板,分别于接种后的第 1、3、5 天开始用酶标仪检测细胞密度,每孔加入 10 μL CCK-8,培养箱孵育 2 h 后酶标仪检测 450 nm 波长下数值,比较 7 种不同培养条件下牙龈成纤维细胞的增殖活性。

1.4.2 最佳浓度 PRFe 流式细胞周期检测 取第 4 代 HGFs,在培养瓶中培养 24 h。实验组分别为 DMEM+2.5% PRFe、DMEM+5% PRFe,同时设置正常对照组,即培养液为含 10% FBS 的 DMEM。培养 72 h,胰蛋白酶消化收集对数生长期的细胞,转移到 10 mL 离心管中,离心 5 min,弃上清液;用预冷的 PBS 清洗重悬细胞两次;逐滴加入预冷的无水乙醇 700 μL (终浓度 70%),固定细胞,再次冷 PBS 清洗细胞,400 μL 冷 PBS 重悬细胞,加入 Rnase A 20 μL 水浴,细胞计数,将细胞数调整到 1×10^6 个,加入 400 μL PI 染液,避光,流式细胞仪检测细胞周期情况。

1.4.3 中和 PDGF 对牙龈成纤维细胞增殖的影响 通过确定 PRFe 促进牙龈成纤维细胞增殖的最佳浓度为 5%,然后收获 P4 代细胞,重悬细胞共分为 4 组,DMEM 组、DMEM+5% PRFe 组、DMEM+5% PRFe+10 μL Anti-PDGF 抗体组、DMEM+10 μL Anti-PDGF 抗体组,悬液调整浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,接种于 96 孔板中,每孔 100 μL 细胞悬液,于接种后的第 1、3、5 天使用酶标仪检测细胞密度,详细步骤同上。

1.5 统计学处理

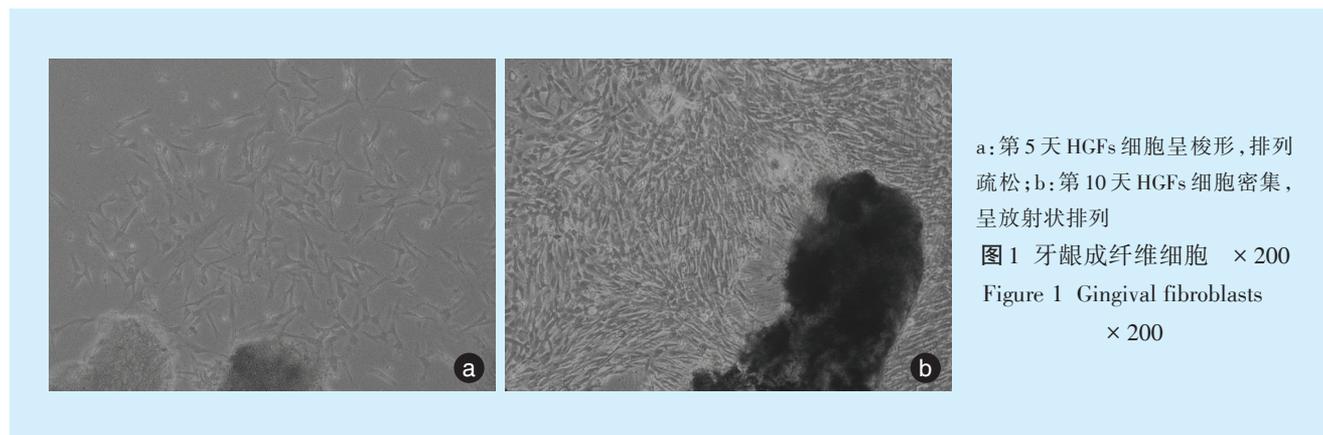
采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用方差分析,不同时间点 PRF 释放 PDGF 总量用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人牙龈成纤维细胞培养结果

牙龈组织块培养第5天,镜下观察可见牙龈组织块周围出现游离细胞,呈梭形,边界清晰,排列

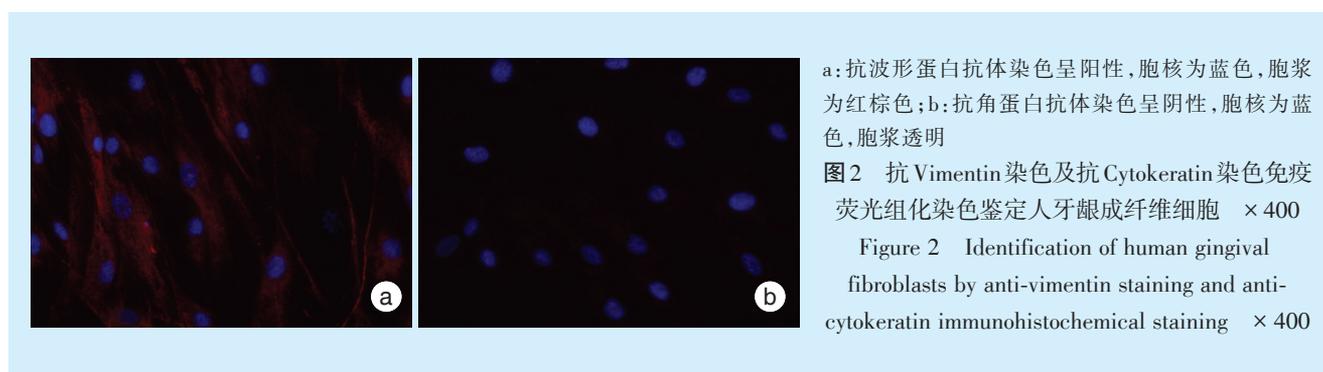
较疏松(图1a);组织块培养第10天,镜下可见游离细胞数目明显增多,梭形胞体边界清晰,形态饱满,细胞排列密集,且呈现出层叠状、放射状、火焰状的规律性排列(图1b)。



2.2 人牙龈成纤维细胞鉴定结果

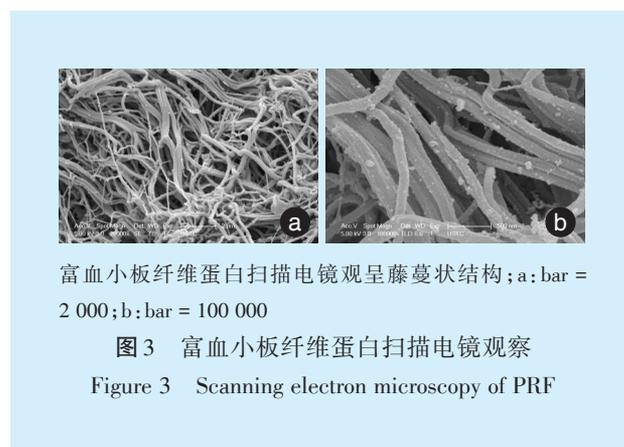
免疫荧光组化结果显示,标本抗 Vimentin 染色均为阳性,镜下表现为梭形细胞椭圆形胞核均质蓝染,胞浆则被染为红棕色,见图2a。标本抗 Cytokeratin 染色均为阴性,镜下见细胞核为蓝色,胞浆

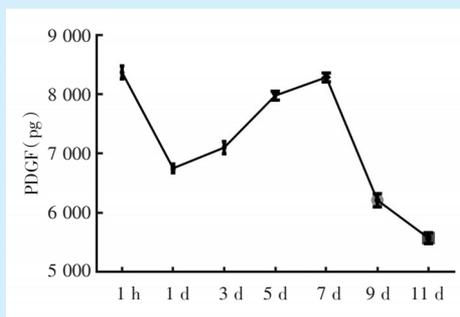
透明不着色,见图2b。通过抗波形蛋白抗体阴性表达及抗角蛋白抗体阳性表达,可以证明该细胞为中胚层非上皮来源细胞,结合取材部位可以明确为牙龈成纤维细胞。



2.3 富血小板纤维蛋白形态、扫描电镜观察及 PDGF 的 ELISA 检测结果

富血小板纤维蛋白性状:大体观富血小板纤维蛋白凝胶由淡黄色凝胶层及其下方少许红细胞层组成。富血小板纤维蛋白扫描电镜图:扫描电镜显示富血小板纤维蛋白排列呈藤蔓状,为三维网状结构(图3)。富血小板纤维蛋白释放 PDGF 的 ELISA 定量检测结果表明 PRF 中 PDGF 呈突释效应,在第1小时很高,然后逐渐降低,后又自第1天到第7天逐渐升高,在第7天达到峰值($F = 492.6$, $P < 0.05$)(图4)。





PRF的PDGF水平在制备后第1个小时暴释,后逐渐降低,第1天后逐渐上升,第7天达到峰值

图4 富血小板纤维蛋白释放PDGF ELISA 定量检测
Figure 4 Quantitative detection of platelet-rich fibrin release by PDGF ELISA

表1 各时间点各组吸光度均值比较

Table 1 Comparison of mean absorbance values in each group at different time points

时间	对照组	2.5%PRFe	5%PRFe	7.5%PRFe	10%PRFe	12.5%PRFe	15%PRFe	F值	P值
1 d	0.417 ± 0.023	0.537 ± 0.008	0.574 ± 0.024	0.614 ± 0.025 ¹⁾	0.658 ± 0.069 ¹⁾	0.647 ± 0.01 ¹⁾	0.684 ± 0.014 ¹⁾	7.346	0.030
3 d	0.683 ± 0.022	1.301 ± 0.171 ¹⁾	1.461 ± 0.037 ¹⁾	1.457 ± 0.075 ¹⁾	1.41 ± 0.107 ¹⁾	1.478 ± 0.092 ¹⁾²⁾	1.502 ± 0.06 ¹⁾²⁾	52.553	0.028
5 d	0.932 ± 0.041	1.627 ± 0.051 ¹⁾	2.011 ± 0.024 ¹⁾²⁾	2.004 ± 0.024 ¹⁾²⁾	2.011 ± 0.031 ¹⁾²⁾	1.931 ± 0.019 ¹⁾²⁾	1.966 ± 0.048 ¹⁾²⁾	226.428	0.011

注 1):与对照组相比 $P < 0.05$; 2):与2.5%PRFe组相比 $P < 0.05$

2.6 中和PDGF对牙龈成纤维细胞增殖影响的结果

CCK8结果表明中和PRFe中部分PDGF,第1天5%PRFe组(0.612 ± 0.03)与对照组(0.418 ± 0.018)及Anti-PDGF组(0.421 ± 0.082)相比差异有统计学意义($P < 0.05$),其余组间差异无统计学意义($P > 0.05$);第3天5%PRFe组(1.646 ± 0.11)与对照组(0.661 ± 0.03)、Anti-PDGF+5%PRFe组(1.089 ± 0.053)、Anti-PDGF组(0.632 ± 0.03)相比差异有统计学意义($P < 0.05$);第5天5%PRFe组(1.922 ± 0.038)与对照组(0.942 ± 0.139)、Anti-PDGF+5%PRFe组(0.889 ± 0.082)、Anti-PDGF组(0.771 ± 0.04)相比差异有统计学意义($P < 0.05$)(图5)。

3 讨论

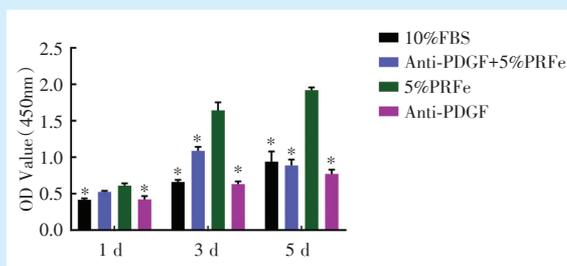
在临床中,常遇到因牙周疾患或某些局部促进因素等所导致的牙龈退缩,为治疗牙龈退缩,国内外学者开发出多种牙周膜龈手术术式,如上皮下结缔组织移植术(subepithelial connective tissue graft, SCTG)^[7]、游离龈移植术(free gingiva graft, FGG)^[8]、冠向复位瓣术(coronally advanced flap, CAF)等术式及各类复合术式^[9]。膜龈手术术式繁

2.4 确定PRFe培养牙龈成纤维细胞的最佳浓度结果

通过CCK8测定不同浓度的PRFe对于牙龈成纤维细胞增殖影响的OD值,第3天和第5天各组与对照组相比差异均有统计学意义;但高于5%浓度后各组与5%PRFe组相比差异均无统计学意义,表明5%PRFe为最佳浓度(表1)。

2.5 PRFe流式细胞周期检测结果

结果显示5%PRFe组细胞S期比例(11.48 ± 0.12)%高于2.5%PRFe组(6.65 ± 0.37)%,且与10%FBS组(9.64 ± 0.50)%相比,差异也具有统计学意义($P < 0.05$)。



注 *: $P < 0.05$ vs 5%PRFe组

图5 中和PDGF对牙龈成纤维细胞增殖的影响
Figure 5 Effect of anti-PDGF on gingival fibroblast proliferation

多,其最终目的都是获取完全的根面覆盖和良好的美观效果。同时国内外学者也开发出各类生物材料,促进牙龈软组织的愈合,常用的有釉基质蛋白(enamel matrix derivative, EMD)、PRF、猪胶原基质(porcine collagen matrix, PCM)等,而PRF由于含有大量的生长因子和抗菌肽等成分,它不仅具有良好的抗炎作用,更有助于促进软硬组织的再生。Kuka等^[10]将24名患者分为CAF+PRF组和CAF组,术后结果显示CAF+PRF组获得了更好的角化龈厚度。

而 Clipet 等^[11]为证明 PRF 在牙种植学领域中应用的意义,通过体外实验测试 3 种与之有关的细胞,包括成骨细胞,成纤维细胞和上皮细胞,通过 PRF 培养上述 3 种细胞,结果表明 PRF 可以促进上述细胞的增殖活性。Vahabi 等^[12]研究两种富血小板纤维蛋白产物对于牙龈成纤维细胞的影响,结果表明富血小板纤维蛋白膜对于牙龈成纤维细胞增殖有促进作用。前人的基础研究观察富血小板纤维蛋白对牙龈软组织细胞的促进作用,但大多是采用人工修剪膜状结构,导致实验设计很难保证均一性,这在一定程度上影响了实验结果的可靠性。而本实验通过制取富血小板纤维蛋白,并将其转变为 PRFe,观察不同浓度 PRFe 对牙龈成纤维细胞增殖的影响,结果表明随着培养基中 PRFe 浓度的不断增加,细胞 CCK8 增殖效果也随之增加,当浓度超过 5% 以后,结果虽有波动,但无统计学差异,表明 PRFe 对于牙龈成纤维细胞的促进作用呈浓度依赖性,在 5% PRFe 浓度时达到一个峰值。而 PRF 中含有多种生长因子,主要有 PDGF、VEGF、TGF- β 等,其中 PDGF 生长因子是细胞迁移、增殖和存活的重要调节因子。为研究 PRF 释放的 PDGF 是否在促进牙龈成纤维细胞的增殖中起重要作用,本实验定量中和部分 PDGF 生长因子,实验发现在第 3 天时 Anti-PDGF 组细胞增殖程度较 5% PRFe 组减低,在第 5 天时甚至抑制呈现负增长,说明 PDGF 在牙龈成纤维细胞的增殖过程起重要作用。

综上所述,本实验将 PRF 转化为 PRFe 的方式,相对精确定量地比较 PRF 对于牙龈成纤维细胞增殖的促进作用,证明 5% 浓度的 PRFe 体外促进牙龈成纤维细胞的效果最佳,并证实 PRF 中所释放的 PDGF 在促进牙龈成纤维细胞的增殖中起着重要作用,这也为临床上将 PRF 应用于膜龈手术以及各类软组织再生手术中提供重要的依据。但关于 PDGF 与其释放的其它生长因子如 VEGF, TGF- β 等对牙龈成纤维细胞增殖作用的比较有待后续进一步研究。

参考文献

[1] Tunaliota M, Ozdemir H, Arabaciota T, et al. Clinical evaluation

- of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of multiple adjacent gingival recession defects: a 12-month study[J]. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2015, 35(1): 105-114.
- [2] Kobayashi E, Fluckiger L, Fujioka-Kobayashi M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF [J]. *Clin Oral Investig*, 2016, 20(9): 2353-2360.
- [3] Poli PP, Cicciu M, Beretta M, et al. Peri-implant mucositis and peri-implantitis: a current understanding of their diagnosis, clinical implications, and a report of treatment using a combined therapy approach[J]. *J Oral Implantol*, 2017, 43(1): 45-50.
- [4] Mufti S, Dadawala SM, Patel P, et al. Comparative evaluation of platelet-rich fibrin with connective tissue grafts in the treatment of miller's class I gingival recessions[J]. *Contemp Clin Dent*, 2017, 8(4): 531-537.
- [5] Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, et al. Platelet-Rich fibrin and soft tissue wound healing: a systematic review[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2017, 23(1): 83-99.
- [6] Culhaoglu R, Taner L, Guler B. Evaluation of the effect of dose-dependent platelet-rich fibrin membrane on treatment of gingival recession: a randomized, controlled clinical trial[J]. *J Appl Oral Sci*, 2018, 26: e20170278.
- [7] Garcia-De-La-Fuente AM, Aguirre-Zorzano LA, Estefania-Fresco R, et al. Histologic and clinical study of gingival recession treated with subepithelial connective tissue graft: a case report[J]. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2017, 37(1): 89-97.
- [8] Jenabian N, Bahabadi MY, Bijani A, et al. Gingival unit graft versus free gingival graft for treatment of gingival recession: a randomized controlled clinical trial[J]. *J Dent (Tehran)*, 2016, 13(3): 184-192.
- [9] Cairo F, Nieri M, Pagliaro U. Efficacy of periodontal plastic surgery procedures in the treatment of localized facial gingival recessions. A systematic review[J]. *J Clin Periodontol*, 2014, 41(15, SI): S44-S62.
- [10] Kuka S, Ipci SD, Cakar G, et al. Clinical evaluation of coronally advanced flap with or without platelet-rich fibrin for the treatment of multiple gingival recessions[J]. *Clin Oral Investig*, 2018, 22(3): 1551-1558.
- [11] Clipet F, Tricot S, Alno N, et al. In vitro effects of choukroun's platelet-rich fibrin conditioned medium on 3 different cell lines implicated in dental implantology[J]. *Implant Dent*, 2012, 21(1): 51-56.
- [12] Vahabi S, Vaziri S, Torshabi M, et al. Effects of plasma rich in growth factors and platelet-rich fibrin on proliferation and viability of human gingival fibroblasts[J]. *J Dent (Tehran)*, 2015, 12(7): 504-512.

(编辑 罗燕鸿, 曾曙光)