

低浓度尼古丁对大鼠硬腭软组织缺损愈合的影响

张亚军¹, 杨聪翀², 刘来奎², 张梦洁³, 孙应明³ (¹安徽医科大学口腔医学院, 安徽省合肥市 230032; ²南京医科大学附属口腔医院基础教研室, 江苏省南京市 210029; ³解放军101医院口腔科, 江苏省无锡市 214044)

文章亮点:

1 外源性生长因子能够促进创伤愈合并且已经被应用于临床,但是由于生长因子价格昂贵,局部使用代谢快、无法在局部持续发挥作用以及使用不便,尤其在口腔黏膜和颌骨骨折创伤中使用不便而影响其在颌面部创伤治疗临床上的推广使用。

2 尼古丁价格低廉,国外最新研究报告已经证实低浓度的尼古丁局部使用能够刺激血管新生、促进伤口愈合,本课题以低浓度尼古丁为切入点,研究制备低浓度尼古丁凝胶缓释系统,为临床加速颌面部软硬组织创伤修复寻找一种安全、便捷、高效、价格低廉的方法提供新思路、新方法。

关键词:

组织构建; 软组织构建; 尼古丁; 软组织缺损; 凝胶; 创面愈合率; 硬腭; 国家自然科学基金

主题词:

尼古丁; 腭裂; 腭, 硬; 软组织损伤; 口腔粘膜

基金资助:

国家自然科学基金(81272968)

摘要

背景: 最新系列研究发现低浓度尼古丁具有促进血管生成,加速皮肤伤口愈合的作用,但低浓度尼古丁能否在颌面部软组织创伤修复中尤其是口腔黏膜创伤修复中发挥作用目前还不清楚。

目的: 观察低浓度尼古丁对大鼠硬腭黏膜缺损修复的影响。

方法: Wistar 大鼠 65 只,于硬腭第一磨牙近中至第三磨牙远中的黏膜作一直径为 3 mm 的圆形切创缺损。造模后局部给药,大鼠随机分成低浓度尼古丁+凝胶组、凝胶组、空白对照组,每组动物分别在 3, 7, 10, 14 d 处死,苏木精-伊红染色观察组织愈合过程,并通过大体标本结合图像测量分析比较各组间伤口愈合差异。

结果与结论: 修复后 3 d 各组间愈合情况差异无显著性意义; 修复后 7, 10 d 组低浓度尼古丁+凝胶组愈合快于凝胶组和空白对照组($P < 0.05$); 修复后 14 d 各组创面已基本愈合,各组间差异无显著性意义。提示低浓度尼古丁可能具有促进大鼠硬腭黏膜缺损修复的作用。

张亚军, 杨聪翀, 刘来奎, 张梦洁, 孙应明. 低浓度尼古丁对大鼠硬腭软组织缺损愈合的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(15):2326-2331.

Effect of low concentration of nicotine on soft tissue defect repair of rat hard palate

Zhang Ya-jun¹, Yang Cong-chong², Liu Lai-kui², Zhang Meng-jie³, Sun Ying-ming³ (¹School of Stomatology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China; ²Department of Stomatology, Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; ³Department of Dentistry, the 101 Hospital of Chinese PLA, Wuxi 214044, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Low concentration of nicotine promotes the angiogenesis and facilitates the healing of skin wounds. However, the role of low concentration of nicotine on the repair of maxillofacial soft tissue trauma especially oral mucosa still remains unclear

OBJECTIVE: To evaluate the effect of low concentration of nicotine on mucosa defect repair of rat hard palate.

METHODS: A circular soft tissue defect at 3 mm diameter was produced in the centre of hard palate of 65 Wistar rats. After the operation, animals were randomly divided into low concentration of nicotine with gel group, gel group and control group. Rats were sacrificed at 3, 7, 10 and 14 days post-surgery. The wound healing was detected with hematoxylin-eosin staining and the difference of wound healing in different groups was compared with gross observation and image measurement.

RESULTS AND CONCLUSION: There was no significant difference in the wound healing in different groups on day 3 post-surgery. On days 7 and 10, the group of low concentrations of nicotine with gel was faster than gel group and control group ($P < 0.05$); the wounds were completely healed on day 14, with no significant difference among the groups. Low concentrations of nicotine may promote the mucosa defects repair of rat hard palate.

Subject headings: nicotine; cleft palate; palate, hard; soft tissue injuries; mouth mucosa

张亚军, 男, 1987 年生, 安徽省阜阳市人, 汉族, 安徽医科大学在读硕士, 主要从事口腔专业的研究。

通讯作者: 孙应明, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 解放军 101 医院口腔科, 江苏省无锡市 214044

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.15.006
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)15-02326-06

稿件接受: 2014-02-22

Zhang Ya-jun, Studying for master's degree, School of Stomatology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

Corresponding author: Sun Ying-ming, M.D., Associate chief physician, Associate professor, Master's supervisor, Department of Dentistry, the 101 Hospital of Chinese PLA, Wuxi 214044, Jiangsu Province, China

Accepted: 2014-02-22

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81272968

Zhang YJ, Yang CC, Liu LK, Zhang MJ, Sun YM. Effect of low concentration of nicotine on soft tissue defect repair of rat hard palate. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(15):2326-2331.

0 引言 Introduction

现阶段, 修复口腔组织缺损的方法较多, 硬腭软组织修复是其中常用的且疗效确实的方法之一, 有其独特的优点。硬腭骨膜附于黏膜和黏膜下层较附于骨面更为紧密, 故在腭瓣的制作时, 常将黏膜、黏膜下层和骨膜视为整体从骨面分离^[1-2], 以形成血运充足的组织瓣。腭瓣结构坚韧, 易于从骨面剥起且血供丰富, 容易形成组织瓣。及时修复硬腭组织缺损、矫正局部畸形对恢复口腔正常功能十分必要。硬腭软组织的特点包括^[3-4]: ①黏膜下层前部含有少量脂肪, 无腺体; 后部则有较多的腭腺。②硬腭的骨膜与黏膜下层附着紧密, 而与骨面附着则不太紧密。③黏骨膜不易移动, 能耐受摩擦和咀嚼压力。

临床上对于口腔软组织缺损时多采用自体游离皮瓣、肌皮瓣、局部转移黏膜瓣等移植修复缺损, 以保证移植植物在口腔特殊环境中的成活; 但这些方法的局限和缺点也逐渐暴露。随着组织工程学的发展, 凝胶因为其较好的生物相容性、可降解性、具有凝血作用^[5-6], 纤维网络结构有利于细胞的黏附等特点, 且有研究对体外细胞在几种膜材料上的黏附、增殖和分化等进行比较, 结果显示凝胶效果最好, 近年来其已广泛地用于口腔软组织缺损的修复, 取得了不同程度的效果。

尼古丁是香烟的有毒成分之一, 有不少报道认为尼古丁对伤口愈合产生了负面的影响, 主要通过抑制角质化细胞, 成纤维细胞和巨噬细胞的增殖或迁移, 增加组织血管收缩, 减少营养性血流量等机制从而延迟伤口愈合^[7-11]。然而最新系列研究发现低浓度尼古丁具有促进血管生成, 加速皮肤伤口愈合的作用。颌面部因其较身体其他部位更暴露且受到的保护更少而成为创伤最常见的部位之一^[12-14], 平时因交通事故、坠落等意外事故导致颌面部损伤发生率占外伤患者的34%^[15], 低浓度(10^{-4} mol/L)尼古丁能否在颌面部软组织创伤修复中, 尤其是口腔黏膜创伤修复中发挥作用目前还不清楚。尼古丁具有价格低廉的优点, 实验将通过制备低浓度尼古丁凝胶缓释剂初步观察其对大鼠口腔硬腭软组织损伤修复的影响, 为临床加速口腔黏膜创伤修复寻找一种安全、便捷、价格低廉的方法提供新思路、新方法。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 动物实验观察。

时间及地点: 实验于2013年2至10月在南京医科大学口腔研究所完成。

材料:

实验动物: 选用健康清洁级Wistar雄性大鼠65只, 8

周龄, 体质量为 (250 ± 10) g, 由扬州大学实验动物中心提供, 动物质量合格证号Scxk(苏)2012-0004。所有大鼠饲养在南京医科大学口腔研究所动物房, 自由摄食、饮水。适应性饲养1周后进行实验。实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。

主要试剂及仪器: 尼古丁、对羟基苯甲酸乙酯、羟甲基纤维素钠购于美国sigma公司, 甘油购于中国Biosharp公司。

方法:

伤口模型及标本制备: 以10%的水合氯醛, 按照3 mL/kg行大鼠腹腔注射麻醉后, 体积分数70%宜春、碘伏消毒, 使用皮肤活检打孔器于大鼠上腭中央环切一直径3 mm切口^[16], 深达骨面, 中间黏膜使用尖锐器械取下, 暴露骨面, 压迫止血。5只老鼠在创伤模型完成后立即处死, 时间记为0 d, 其余60只实验动物随机数字表法均分为低浓度尼古丁+凝胶组: 大鼠上腭软组织缺损局部给予 10^{-4} mol/L低浓度尼古丁凝胶缓释剂; 凝胶组: 软组织缺损局部给予单纯凝胶制剂; 空白对照组: 腭部伤口不做任何处理。每组每天给药1次: 动物轻度麻醉, 在不碰触伤口的情况下, 钝性注射器将药物注射在伤口表面, 每次每只0.5 mL。给药后2 h, 允许老鼠正常自由摄食、饮水。所加试剂如下:

凝胶: 对羟基苯甲酸乙酯0.04g+羟甲基纤维素钠1.20+甘油3.00 g+加ddH₂O至20 g; 凝胶+低浓度尼古丁: 对羟基苯甲酸乙酯0.04 g+羟甲基纤维素钠1.20+甘油3.00 g+ 10^{-4} mol/L尼古丁水溶液至20 g。

实验开始后, 分别于造模后第3, 7, 10, 14天每组以注射过量麻药的方法处死5只老鼠。动物处死后, 分离上颌骨采集图像, 所有图片确保在相同距离参数下拍摄, 以保证图像大小相同。40 g/L多聚甲醛固定至少24 h, 脱水, 每个标本由矢状面中央切开石蜡包埋, 从中央最宽直径处向两侧做5 μ m的连续切片, 行常规苏木精-伊红染色, 光镜下观察。

主要观指标:

组织学观察: 苏木精-伊红染色, 光镜观察大鼠硬腭软组织缺损伤口愈合一般过程。

大体观察: 实验过程中观察大鼠测量大鼠质量及进食情况是否正常, 伤口有无感染、出血, 确保腭部伤口不影响实验结果。实验开始后3, 7, 10, 14 d 4个时间点, 取每组分别处死5只大鼠后分离的上腭, 在相同参数(相机与上腭标本创面保持相同距离)下取像。数码照片被转移至电脑分析比较伤口直径、面积。

统计学分析: 使用SPSS 13.0统计软件, 对各实验组不同时间点伤口愈合率进行统计分析。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 轻度麻醉下每日给药1次, 涂布于创面, 实验结束, 手术创面无感染, 均达到一期愈合, 大鼠均活至实验结束, 未见排斥现象。实验为意向性分析。

2.2 镜下观察 实验中各组均由外部给药, 因此各组间伤口愈合的病理特点基本相同, 实验初始, 可见刚创建的伤口上皮缺损和裸露的上颌骨; 在修复后第3天, 伤口处可见大量的血清纤维素和细胞碎片, 组织下方炎性细胞浸润; 修复后7-10 d时, 各组上皮层未完全形成, 但凝胶+低浓度尼古丁组可见较多的炎性细胞、成纤维细胞和新生血管形成, 修复后14 d上皮细胞增殖, 逐渐向伤口中央移行, 创面完全关闭(图1)。

2.3 大体观察 修复后大鼠状态良好, 均活至实验完成。对照组修复后第3天可见骨面上覆盖一层血清纤维素层, 边缘变得不规整, 并向伤口中心缓慢迁移; 第7天到第10天, 纤维素层覆盖的面积明显减小; 修复后14 d, 创面基本为上皮层覆盖, 肉眼观无差异(图2)。

2.4 创伤愈合情况比较 通过数字图像分析发现建模后3 d各组间创面面积相当, 差异无显著性意义; 修复后7 d, 实验组大鼠上腭创面面积略小于空白组和凝胶组, 差异无显著性意义; 建模后10 d实验组大鼠上腭创面愈合率为 $(91.00 \pm 3.14)\%$, 凝胶组为 $(81.00 \pm 2.62)\%$, 对照组为 $(79.00 \pm 4.60)\%$; 可见实验组创面面积明显小于空白组和凝胶组, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 同时可见凝胶组略快于空白组。修复后14 d组各组创面基本完成愈合, 各组间差异无显著性意义。上皮层覆盖, 肉眼观无差异(图3)。

3 讨论 Discussion

创面愈合是一个复杂而又高度协调的过程, 包括炎症反应、组织细胞增殖和组织重建3个互相重叠但又具有不同特点的阶段^[17-18]。本质上是机体对各种有害因素作用所致的组织细胞损伤的一种固有的防御性适应性反应。这种再生修复表现在丧失组织结构的恢复上, 也能不同程度地恢复其功能^[19-20]。

尼古丁长期以来被认为对创伤愈合产生了负面的影响, 然而, 越来越多的研究报告显示, 低浓度的尼古丁局部使用会产生完全不同、令人意想不到的生物学效应^[21]。Heeschen等^[22-23]一系列研究发现低浓度尼古丁能够促进内皮细胞的增殖和小管的形成, 在鼠的后肢缺血的动物模型上, 采用肌肉注射尼古丁能够增加毛细血管的密度, 增加血管的尺寸和数量、同时增加血流量。进一步的研究证实局部采用低浓度尼古丁(10^{-8} mol/L, 10^{-9} mol/L)能够明显加速糖尿病小鼠证伤口的愈合^[24]。Liem等^[25]发现 10^{-4} mol/L尼古丁能够加速正常鼠皮肤伤口愈合, 其效果与碱性成纤维生长因子(25 μ g/kg)的作用相当, 并且二者联合使用具有协同效应。

实验将通过制备低浓度尼古丁凝胶缓释剂初步观察了尼古丁对大鼠口腔硬腭软组织损伤修复的影响。实验发现, 在大鼠上腭创伤模型上, 造模后第7, 10天结合 10^{-4} mol/L低浓度尼古丁的载体凝胶实验组较单纯凝胶组和空白组出现了愈合加速现象, 而第3天各组间没有明显差异, 提示经过一定时间的施用低浓度尼古丁可能促进口腔软组织缺损愈合, 该实验结果与国外学者在皮肤创伤愈合相关研究结果一致。但是实验还未能就低浓度尼古丁如何影响大鼠硬腭软组织愈合的机制进行探讨。

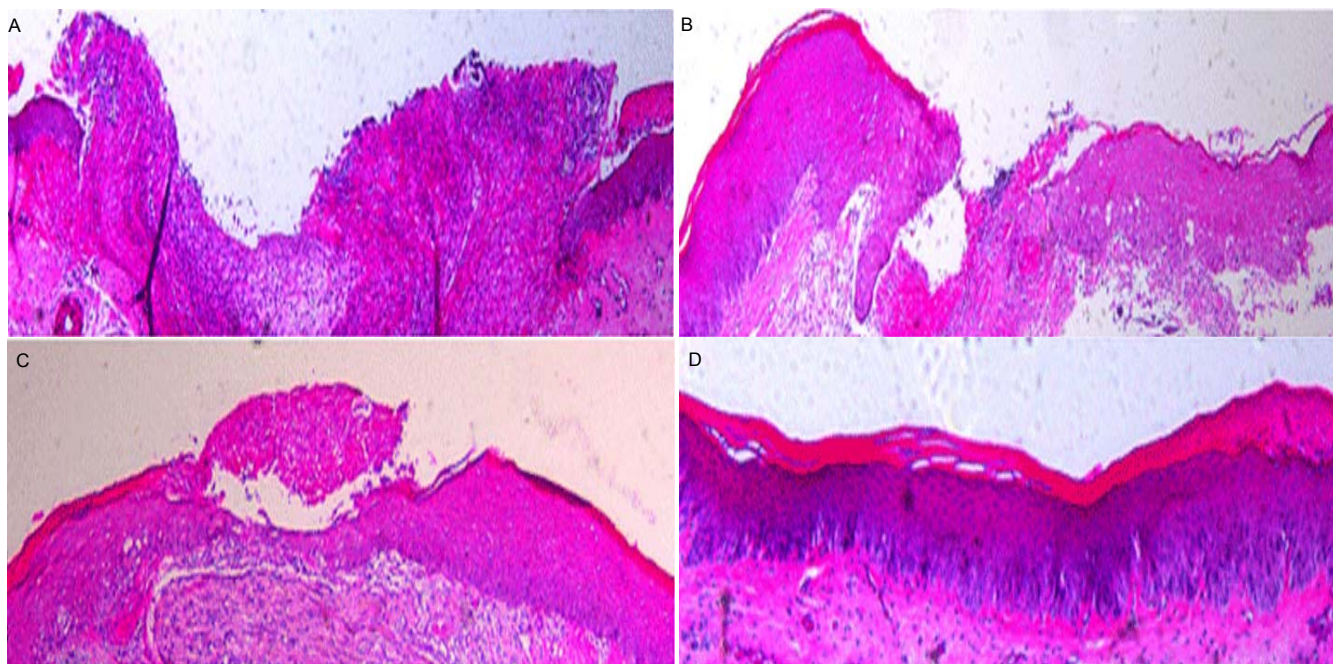


图1 低浓度尼古丁对大鼠硬腭软组织缺损修复后伤口愈合情况(苏木精-伊红染色, $\times 50$)

Figure 1 The effects of low concentration of nicotine on the healing of the wounds after mucosa defect repair of rat hard palate (hematoxylin and eosin staining, $\times 50$)

图注: 图中A-D为修复后3, 7, 10, 14 d(凝胶+低浓度尼古丁组), 可见伤口逐渐愈合, 创面完全关闭。

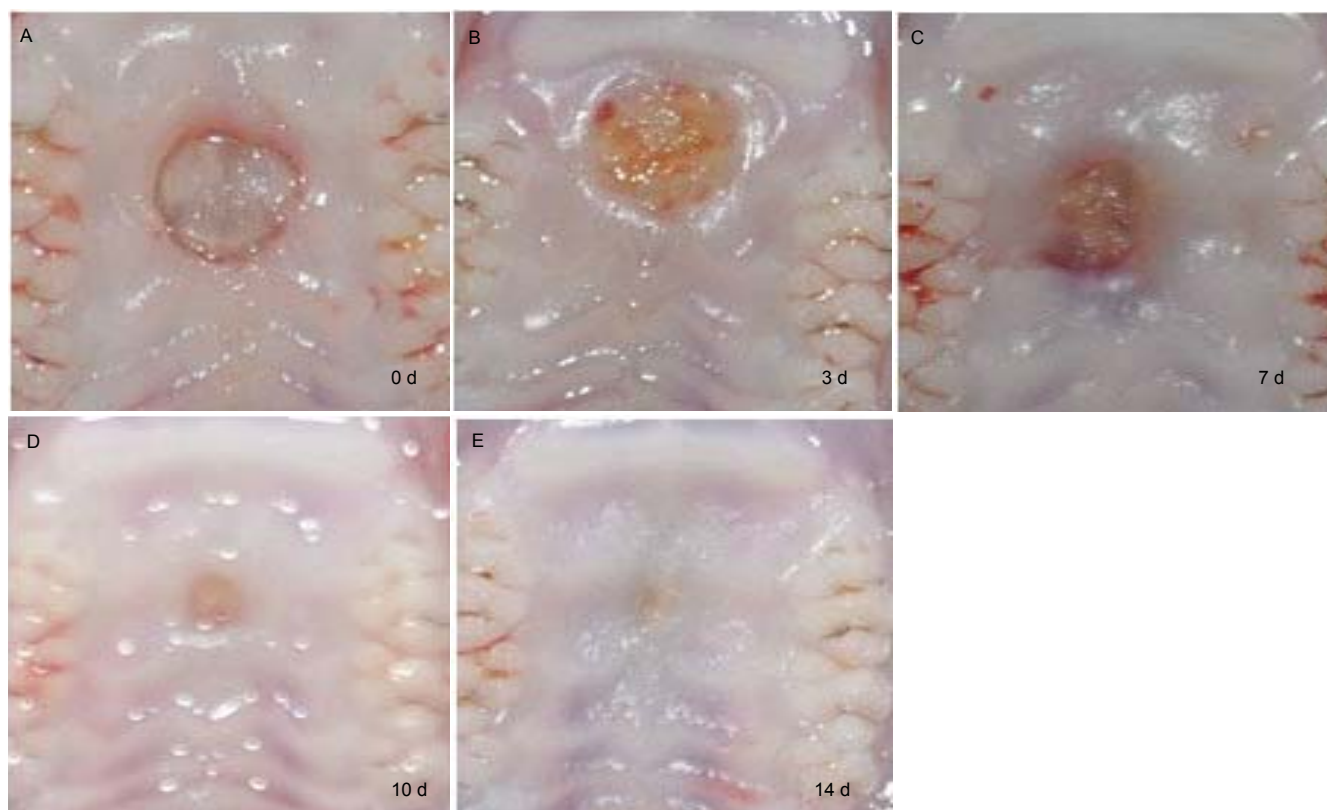


图2 自然愈合(空白组)的大鼠上腭创面大体观察

Figure 2 Gross observation of the palatal wounds in control group (showing gradual healing)

图注: 建模后第0, 3, 7, 10 和 14 天, 可以看出逐渐愈合的过程。

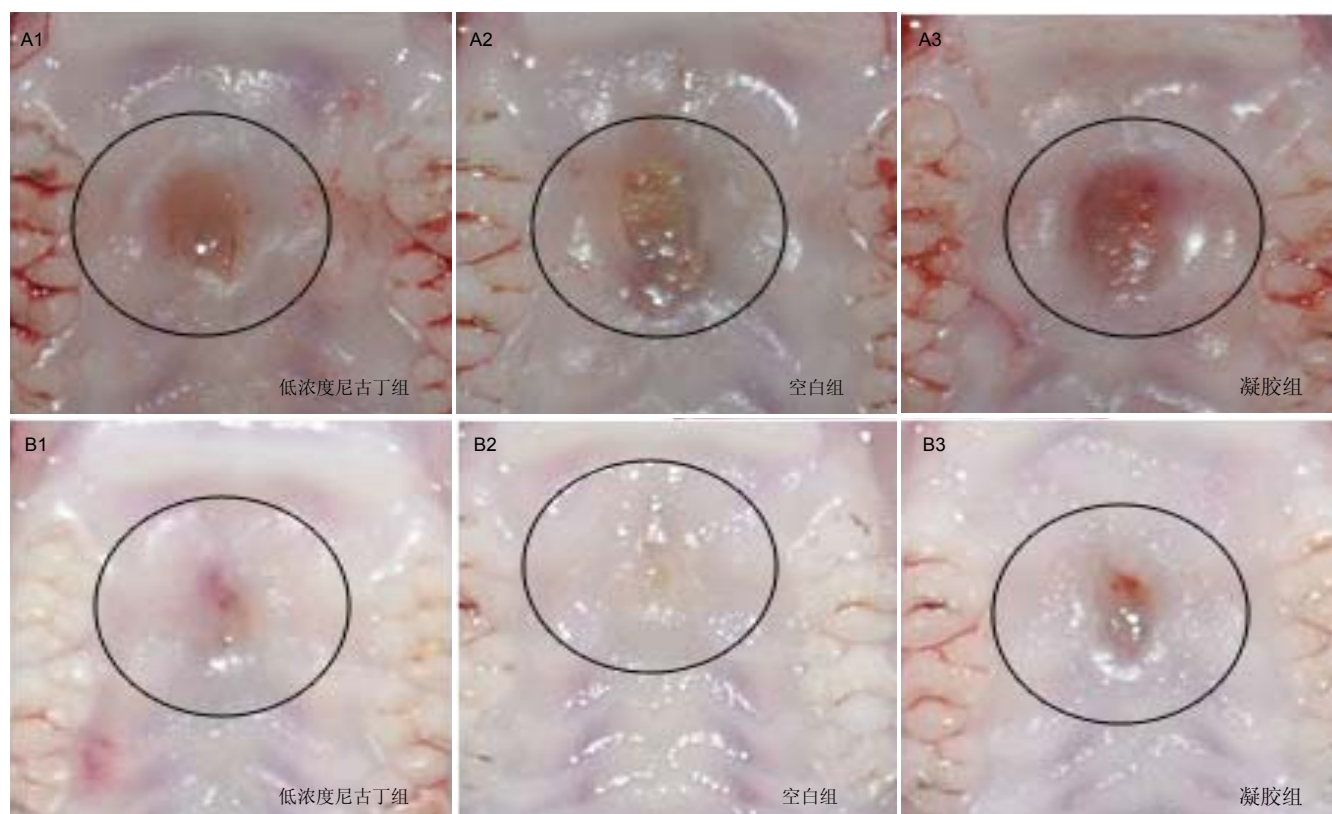


图3 不同干预方法修复大鼠上腭创面缺损后第7天和第10天的创面图像

Figure 3 The wounds in different groups on days 7 and 10 after different interventions

图注: 图中A为第7天创面图像, B为第10天创面图像。可见低浓度尼古丁组创面面积明显小于空白组和凝胶组, 同时可见凝胶组略快于空白组。

有国外学者发现尼古丁能够刺激体外培养内皮细胞的迁徙、增殖和小管的形成,以上这些都是血管再生的主要步骤^[26]。另有研究证实尼古丁能够刺激DNA的合成以及内皮细胞的增殖^[27-28]。尼古丁诱导血管生成的机制可能是多方面的,国外学者进一步的研究发现尼古丁的血管生成效应是由尼古丁乙酰胆碱受体(nAChRs)介导的^[29]。体外研究发现,刺激这些内皮细胞的受体会引起培养的内皮细胞在生长、形态和功能方面的变化,这些变化都是血管生成反应的特征。从狗和人获得的内皮细胞培养证实到尼古丁能够改变内皮细胞NO合成酶的活动以及前列环素的释放^[30]。另外尼古丁已经被证实能够诱导碱性成纤维生长因子和转化生长因子 $\beta 1$ 等生长因子释放的变化^[31-32]。尤其最近,发现尼古丁和其主要的代谢物可替宁能够上调内皮细胞内血管内皮生长因子的表达^[33-34]。

在颌面部创伤修复中,新生血管是至关重要的一步。新生血管可以为创口及时地运送氧气和营养物质,也能及时把代谢废物运走,利于细胞增殖分化以及组织修复。同时,新生血管也参与组织修复调控。越来越多的研究证实局部使用外源性生长因子如成纤维生长因子、血小板源性生长因子、表皮生长因子、转化生长因子 β 等都能不同程度地促进新生血管和肉芽组织的形成、提高局部血流量、促进再上皮化从而在创伤修复中发挥重要作用^[35-37]。因此很多国内外学者在寻求采用以上外源性生长因子来促进颌面部软组织的创伤修复。目前主要问题是如何使用生长因子及其安全性问题,由于生长因子在体内降解速度较快,使用时就应考虑给药时间、附加剂等问题,一些外用生长因子的载体和制剂如凝胶、洗液及绷带正在研究^[38]。至于安全性问题,现有的研究表明,在肿瘤发生中不停增加的生长因子或受体是重要的,但外源性暂时供给的细胞生长因子并不能达到上述发生条件。付小兵等^[39]收集大量的临床资料表明,外用重组细胞生长因子对人体具有较高的安全性,但仍然担心长期应用或局部吸收可能对人体造成不良影响,许多与生长因子相关的药理与毒理问题尚未完全解决,因此在临床应用的同时考察其安全性也成为重要内容。

相对于这些外源性生长因子,国外学者认为尼古丁价格更为低廉,在促进创伤愈合方面可能会有很好的临床应用前景^[40-42]。正如本实验研究结果表明,尼古丁可能促进口腔软组织伤口愈合,成为一种潜在的促进伤口愈合的药物。但也有很多临床试验认为吸烟会导致血液循环系统功能障碍,这主要表现在以下2个方面机制:①尼古丁作用于小动脉管壁的平滑肌,使血流减慢。②吸入的一氧化碳会竞争性地与血红蛋白结合,从而使血液携氧能力下降,影响外周组织的氧供给。因此尽管尼古丁相对于一般生长因子生产简单、价格便宜,但尼古丁有效作用浓度较窄,不易掌握,为减小其可能出现的毒性作用^[34-35],低浓度尼古丁凝胶载体用于临床前,其作用机制和安全性尚需要进一步的研究证实。

致谢: 在本次论文设计完成过程中,感谢高振林、何梦颖、殷越、孔苗苗给予我的帮助,南京医科大学口腔研究所的各位老师给予细致的指导,提出了很多宝贵的意见与建议。谨以此致谢最后,我要向百忙之中抽时间对本文进行审阅的各位老师表示衷心的感谢。

作者贡献: 刘奎奎教授、孙应明教授和张亚军精心设计了本课题,张亚军、杨聪翀和张梦洁进行了实验实施和实验评估,张亚军收集资料、成文,孙应明教授审校,张亚军对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验已通过南京医科大学口腔研究所伦理单位委员会批准。对动物的处置符合医学伦理学标准。

学术术语: 缓释系统-指生长因子与之结合后植入体内时,可持续保持其活性并延长作用时间。这时缓释系统起到了载负生长因子使之与周围组织均匀接触、利于诱导周围细胞的增殖分化、作为组织生长支架促进组织生长三重作用。

作者声明: 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 葛新春,谢正琪,张新宇,等. 颞肌在翼腭窝肿瘤侵犯软硬腭术后缺损修复中的应用[J]. 北京口腔医学,2008,16(6):335-337.
- [2] 宋庆高,石冰,刘亚,等. 羊膜复合组织片修复鼠裸露硬腭骨面的组织学观察[J]. 口腔颌面外科杂志,2007,17(3):213-217.
- [3] Hasegawa M,Fujisawa H,Hayashi Y,et al.Autologous amnion graft for repair of myelomeningocele:technical note and clinical implication.J Clin Neurosci. 2004;11(4):408-411.
- [4] Nunez J, Cafesse R, Vignoletti F, et al. Clinical and histological evaluation of an acellular dermal matrix allograft in combination with the coronally advanced flap in the treatment of Miller class I recession defects: an experimental study in the mini-pig. J Clin Periodontol. 2009;36(6):523-531.
- [5] 杨佑成,左金华,宋冰,等. 脱细胞真皮基质修复硬腭软组织缺损的实验研究[J]. 口腔颌面外科杂志,2008,18(4):243-246.
- [6] 刘双喜,徐淑兰,钟星华,等. 碱性成纤维细胞生长因子/胶原膜修复大鼠硬腭软组织缺损的实验研究[J]. 广东医学,2011,32(11):1388-1391.
- [7] Li H, Samet JM. Global economic and health benefits of tobacco control: part 1. Clin Pharmacol Ther.2009;86(3):263-271.
- [8] Selber JC, Kurichi JE, Vega SJ, et al. Risk factors and complications in free TRAM flap breast reconstruction. Ann Plast Surg. 2006;56(5):492-497.
- [9] Spear SL, Ducic I, Cuoco F, et al. The effect of smoking on flap and donor-site complications in pedicled TRAM breast reconstruction. Plast Reconstr Surg. 2005;116(7):1873-1880.
- [10] Sorensen LT, Hemmingsen U, Kallehave F, et al. Risk factors for tissue and wound complications in gastrointestinal surgery. Ann Surg.2005;241(4):654-658.
- [11] Sorensen LT, Karlsmark T, Gottrup F. Abstinence from smoking reduces incisional wound infection: a randomized controlled trial. Ann Surg 2003;238(1):1-5.
- [12] Sørensen LT, Zillmer R, Agren M, et al.Effect of smoking, abstinence, and nicotine patch on epidermal healing and collagenase in skin transudate. Wound Repair Regen. 2009;17(3):347-353.

- [13] Jacobi J, Jang JJ, Sundram U, et al. Nicotine accelerates angiogenesis and wound healing in genetically diabetic mice. *Am J Pathol.* 2002;161(1):97-104.
- [14] Morimoto N, Takemoto S, Kawazoe T, et al. Nicotine at a low concentration promotes wound healing. *J Surg Res.* 2008;145(2):199-204.
- [15] Zhang S, Day I, Ye S. Nicotine induced changes in gene expression by human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis* 2001;154(2):277-283.
- [16] 潘涛, 张令达, 颜雨春, 等. 硬腭黏骨膜瓣修复软腭部分缺损[J]. 安徽医科大学学报, 2005, 40(3):293-294.
- [17] Morimoto N, Yoshimura K, Niimi M, et al. An exploratory clinical trial for combination wound therapy with a novel medical matrix and fibroblast growth factor in patients with chronic skin ulcers: a study protocol. *Am J Transl Res.* 2012;4(1):52-59.
- [18] Kurosaka M, Suzuki T, Hosono K, et al. Reduced angiogenesis and delay in wound healing in angiotensin I type 1 receptor-deficient mice. *Biomed Pharmacother.* 2009;63(9):627-634.
- [19] 严龙宗, 陈斌. 慢性创面愈合的细胞治疗[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(46):8096-8101.
- [20] 梁玲, 李新平, 白文芳, 等. 低频电磁场在基因修饰表皮干细胞移植修复创面中的作用[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(32):5827-5833.
- [21] 祖丽呼玛·阿热甫江, 潘旭, 米丛波, 等. 尼古丁对大鼠实验性牙移动牙根吸收的影响[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(20):3658-3665.
- [22] Heeschen C, Jang JJ, Pathak A, et al. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med.* 2001;7(7):833-839.
- [23] Arias HR, Richards VE, Ng D, et al. Role of non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(7):1441-1451.
- [24] 何锦泉, 张益. 颌面创伤调查现状[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2006, 4(5):385-388.
- [25] Liem PH, Morimoto N, Ito R, et al. Treating a collagen scaffold with a low concentration of nicotine promoted angiogenesis and wound healing. *J Surg Res.* 2013;182(2):353-361.
- [26] Ozdemir R, Ulusoy MG, Kocer U, et al. Evaluation of osteogenic and chondrogenic activities of prefabricated periallografts. *J Craniofac Surg.* 2005;16(6):1015-1022.
- [27] Heeschen C, Weis M, Cooke JP, et al. Nicotine promotes arteriogenesis. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(3):489-496.
- [28] Villablanca AC. Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. *J Appl Physiol.* 1998;84(6):2089-2098.
- [29] Carty CS, Huribal M, Marsan BU, et al. Nicotine and its metabolite cotinine are mitogenic for human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg.* 1997;25(4):682-688.
- [30] Grando SA. Receptor-mediated action of nicotine in human skin. *Int J Dermatol.* 2001;40(11):691-693.
- [31] Bouterin-Falson O, Blaes N. Nicotine increases basal prostacyclin production and DNA synthesis of human endothelial cells in primary cultures. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1990;32(4):253-258.
- [32] Carty CS, Soloway PD, Kayastha S, et al. Nicotine and cotinine stimulate secretion of basic fibroblast growth factor and affect expression of matrix metalloproteinases in cultured human smooth muscle cells. *J Vasc Surg.* 1996;24(6):927-934.
- [33] Conklin BS, Zhao W, Zhong DS, et al. Nicotine and cotinine up-regulate vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells. *Am J Pathol* 2002;160(2):413-418.
- [34] Cucina A, Sapienza P, Borrelli V, et al. Nicotine reorganizes cytoskeleton of vascular endothelial cell through platelet-derived growth factor BB. *J Surg Res.* 2000;92(2):233-238.
- [35] Cucina A, Borrelli V, Randone B, et al. Vascular endothelial growth factor increases the migration and proliferation of smooth muscle cells through the mediation of growth factors released by endothelial cells. *J Surg Res.* 2003;109(1):16-23.
- [36] 屈纪富, 郝利, 孙薇, 等. 细胞因子在创伤愈合过程中的变化及其意义的研究进展[J]. 创伤外科杂志, 2003, 5(1):74-76.
- [37] Kontio R, Suuronen R, Ponkkonen H, et al. Have the causes of maxillofacial fractures changed over the last 16 years in Finland? An epidemiological study of 725 fractures. *Dent Traumatol.* 2005;21(1):14-19.
- [38] 罗志军, 黎洪棉, 王和庚, 等. 外用重组人表皮生长因子联合壳聚糖创面修复膜凝胶治疗面部Ⅱ度烧伤的疗效观察[J]. 广西医科大学学报, 2013, 30(1):111-113.
- [39] 付小兵, 程飏, 盛志勇, 等. 生长因子应用于临床创伤修复十年的主要进展与展望[J]. 中国修复重建外科杂志, 2004, 18(6):508-509.
- [40] Jin CY, Han MH, Lee SS, et al. Mass producible and biocompatible microneedle patch and functional verification of its usefulness for transdermal drug delivery. *Biomed Microdevices.* 2009;11(6):1195-1203.
- [41] Christen AG, Young JM, Beiswanger BB, et al. Effects of nicotine chewing gum on complete dentures and their soft-tissue-bearing areas. *Int J Prosthodont.* 1989;2(2):155-162.
- [42] 王庆昱, 王小竞. 尼古丁对牙周炎相关细胞影响的研究[J]. 口腔医学研究, 2009, 25(6):797-799.