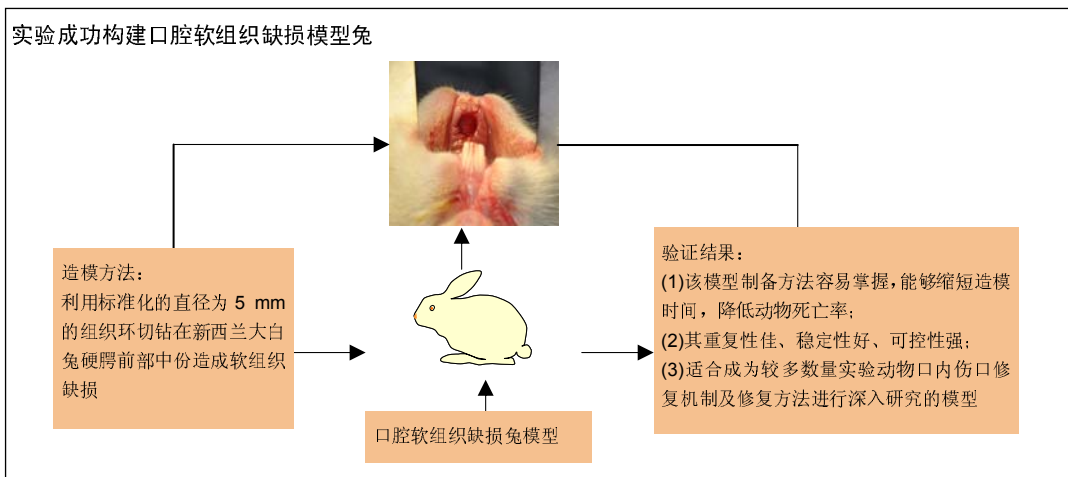


口腔软组织缺损兔模型的构建

杨琴秋¹, 董露², 肖琼³, 陈红亮⁴, 孙勇⁴(¹遂宁市第一人民医院口腔科, 四川省遂宁市 629000; ²凉山彝族自治州第一人民医院口腔科, 四川省西昌市 615000; ³重庆拜博口腔医院管理有限公司九龙坡口腔医院, 重庆市 400000; ⁴解放军成都军区机关医院口腔科, 四川省成都市 610041)

引用本文: 杨琴秋, 董露, 肖琼, 陈红亮, 孙勇. 口腔软组织缺损兔模型的构建[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(18): 2684-2689.
DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.18.015 ORCID: 0000-0002-6436-5768(杨琴秋)

文章快速阅读:



杨琴秋, 女, 1988年生, 硕士, 四川省射洪县人, 汉族, 医师, 主要从事口腔种植义齿修复研究

通讯作者: 孙勇, 男, 主任医师, 教授, 硕士生研究生导师, 解放军成都军区机关医院口腔科, 四川省成都市 610041

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2016)18-02684-06

稿件接受: 2016-02-06

http://www.crter.org

文题释义:

口腔软组织缺损模型: 利用标准化的直径为 5 mm 的组织环切钻在动物硬腭前部中份制备软组织缺损, 不仅符合动物造模的标准一致性原则, 还可以避免单纯利用手术刀片、量尺进行术区制备可能引起的误差及操作不便, 简化了实验操作, 节约了手术时间, 并使得该动物模型稳定性相对更好。

新西兰大白兔: 具有性情温顺, 抗病性及适应性强、饲料利用率高、易于管理及价格经济等优点, 加之其硬腭黏膜与人口腔软组织的组织学结构类似, 在其上制备软组织缺损能更好地接近并反映人类口内软组织创伤修复的一般规律。

摘要

背景: 在口腔种植临床, 对术区软组织缺损修复方法及材料的研究一直在深入。而通过建立可靠的实验动物口腔软组织缺损模型, 会对该领域的探索研究产生积极的深远影响。

目的: 实验旨在建立一种兔口腔软组织缺损动物模型, 以供对口腔软组织缺损修复治疗进行深入的研究。

方法: 在 18 只 3 月龄雄性新西兰兔的硬腭前部中份, 分别距上颌门齿、左右硬腭黏膜边缘 2 mm 处以直径为 5 mm 的组织环切钻制备圆形软组织全层缺损。分别于建模后 3, 7, 14, 21, 28, 56 d 对创面进行形态学和组织学观察。

结果与结论: ①创面形态: 建模后 3, 7 d, 创口炎症反应明显; 随着时间推移, 炎性反应消退, 伤口逐渐愈合。在建模后 21, 28, 56 d 可见明显瘢痕形成; ②创面组织学变化: 在伤后 3, 7 d, 炎细胞大量浸润, 组织坏死面积较大, 建模后 7 d 后, 随着结缔组织增殖和新生毛细血管的广泛形成, 伤口逐渐塑形完整; ③结果说明: 实验成功构建口腔软组织缺损模型兔, 符合创伤愈合的生理规律和人类口腔软组织缺损愈合特点。

关键词:

实验动物; 口腔损伤与修复动物模型; 软组织缺损; 创伤愈合; 新西兰兔; 硬腭; 苏木精-伊红染色; 组织构建

主题词:

组织工程; 模型, 动物; 口腔

基金资助:

成都军区“十二五”科研面上项目(C14050)

Yang Qin-qiu, Master,
Physician, Department of
Stomatology, the First
People's Hospital of
Suining, Suining 629000,
Sichuan Province, China

Corresponding author: Sun
Yong, Chief physician,
Professor, Master's
supervisor, Department of
Stomatology, the Chengdu
Military Authorities Hospital
of Chinese People's
Liberation Army, Chengdu
610041, Sichuan Province,
China

Establishment of a rabbit model of oral soft tissue defects

Yang Qin-qiu¹, Dong Lu², Xiao Qiong³, Chen Hong-liang⁴, Sun Yong⁴ (¹Department of Stomatology, the First People's Hospital of Suining, Suining 629000, Sichuan Province, China; ²Department of Stomatology, the First People's Hospital of Liangshan Yi Autonomous Prefecture, Xichang 615000, Sichuan Province, China; ³Jiulongpo Dental Hospital of Chongqing Bybo Dental Hospital Administrative Limited Company, Chongqing 400000, China; ⁴Department of Stomatology, the Chengdu Military Authorities Hospital of Chinese People's Liberation Army, Chengdu 610041, Sichuan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: In clinical, the research on the method and the material of the soft tissue defect of the operation area has been in depth. It will have a positive impact on our exploration and research in this field through the establishment of reliable experimental animal oral soft tissue defect model.

OBJECTIVE: To establish a rabbit model of oral soft tissue defects for oral treatment of soft tissue defects in-depth study.

METHODS: Eighteen 3-month-old male New Zealand rabbits were enrolled. A tissue ring cutting drill of 5 mm diameter was used to prepare round full-thickness soft tissue defects in the front part of the hard palate and, respectively, from the back of the maxillary incisors, about 2 mm from the hard palate mucosal edge. Morphology and histology were observed at 3, 7, 14, 21, 28 and 56 days after model establishment.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Morphological observation: After 3 and 7 days, the wound's inflammatory reaction was obvious. As the time goes, the inflammatory response subsided, the wound gradually healed. Scar formation was observed at 21, 28 and 56 days after surgery. (2) Histological observation: 3 and 7 days after injury, many inflammatory cells were infiltrating, and tissue necrosis area was larger. At 7 days after surgery, with the extensive formation of connective tissue proliferation and new blood capillaries, the wound gradually shaping completely. (3) Results indicated that a rabbit model of oral soft tissue defects was successfully established, which was in line with the physical laws of wound healing and the characteristics of human oral soft tissue defects healing.

Subject headings: Tissue Engineering; Models, Animal; Mouth

Funding: the Chengdu Military Command "Twelfth-Five-Year" Scientific Research Projects, No. C14050

Cite this article: Yang QQ, Dong L, Xiao Q, Chen HL, Sun Y. Establishment of a rabbit model of oral soft tissue defects. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(18): 2684-2689.

0 引言 Introduction

在口腔种植临床, 术区软组织量不足可能对创面愈合和后期的美学修复产生不利影响^[1-3], 可以通过单独或联合外科手术和组织修复材料对软组织缺损进行修补^[4-11]。其中, 探寻修复口腔软组织缺损的生物材料是近几年来国内外研究的热点和前沿。在基础实验方面, 尤其是动物实验, 要构建一个科学可靠的动物模型对该领域进行相关研究就显得尤为重要。

目前, 国内外对于建立口腔软组织缺损的动物模型采用了不同的动物品种和不同的造模方法^[12-20]。由于学科领域、研究目的、方法等的不同, 尚无统一的造模标准。新西兰兔具有性情温顺, 抗病性及适应性强、饲料利用率高、易于管理及价格经济等优点^[21-22], 加之其硬腭黏膜与人口腔软组织的组织学结构类似^[23], 在其上制备软组织缺损能更好地接近并反映人类口内软组织创伤修复的一般规律, 故实验选择新西兰兔作为实验对象。除此之外, 实验在中国首次利用标准化的直径为 5 mm 的组织环切钻在动物硬腭前份制备软组织缺损,

不仅符合动物造模的标准一致性原则^[21], 还可以避免单纯利用手术刀片、量尺进行术区制备可能引起的误差及操作不便, 简化了实验操作, 节约了手术时间, 并使得该动物模型稳定性相对更好。

实验通过设计新西兰兔口腔软组织缺损模型, 并对其组织愈合特点在建模后进行形态学和组织学的动态观察, 从而为进一步在基础研究中探索修复口腔软组织缺损的方法提供较为可靠的实验动物模型。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 动物模型观察性实验。

1.2 时间及地点 于2014年5至9月在四川大学华西医院动物中心和四川省医学科学院·四川省人民医院药物安全评价中心病理室完成。

1.3 造模动物 健康三月龄雌性新西兰大白兔18只, 体质量2.5-3.0 kg, 由四川大学华西医院动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(川)2013-14。术前在统一条件下适应性分笼喂养1周。动物饲养及手术均在四

川大学华西医院动物中心进行, 实验动物设施使用许可证号: SYXK(川)2013-119。实验动物均在一致的生活环境中单笼饲养, 标准饲料专人喂养; 室温(23±2) °C; 保持兔舍内60%–70%的空气湿度及较好的光照条件; 定时打扫动物房等。实验过程中对实验动物的各项处置符合动物伦理学要求。

1.4 造模方法 动物术前禁食12 h, 禁饮6 h, 并在术前半小时肌注青霉素钠(1×10^5 U/kg), 预防感染。兔称质量后制动, 兔耳麻醉进针处局部备皮、消毒。体积分数3%戊巴比妥钠按1 mL/kg沿耳缘静脉缓慢注入, 麻醉完成后将动物仰卧位固定于手术台上。口内、口周消毒, 铺巾, 在不影响实验兔呼吸的前提下, 开口器撑开口腔, 充分暴露硬腭前份软组织(图1A)。连接好种植机、种植手机和一次性使用口腔输水管后, 将种植手机连接上直径为5 mm的组织环切钻。在有持续的生理盐水冷却降温的情况下, 于硬腭前部中份, 分别距上颌门齿、左右硬腭黏膜边缘2 mm处制备软组织全层缺损, 去除黏骨膜瓣形成圆形缺损区, 并潜行剥离缺损边缘黏骨膜瓣(图1B, C)。注意动作轻柔, 勿损伤骨面。建模后肌注青霉素钠(1×10^5 U/kg), 1次/d, 连续3 d, 预防感染。

1.5 造模成功的检测标准 参照相关的动物造模方法^[12-14], 实验将硬腭术区直径为5 mm的黏骨膜瓣完整地剥离, 并潜行剥离伤口边缘黏膜作为实验造模成功的标准。

1.6 组织学染色 建模后3 d麻醉处死实验动物, 切取硬腭术区以及术区周围2 mm的正常组织, 修剪后以生理盐水冲洗, 固定于40 g/L多聚甲醛中24–72 h。固定以后的标本再置于EDTA脱钙液中脱钙4–6周。

脱钙完成后的标本用自来水冲洗过夜, 各级乙醇脱水、透明、浸蜡, 石蜡包埋, 切片机切片5 μm。切片完成以后进行苏木精-伊红染色处理: 切片脱蜡后, ①苏木精染液染色10–20 min后取出, 自来水冲洗。②体积分数1%的盐酸内分色30 s后取出, 自来水冲洗。③50 °C的温水或弱碱性水溶液中复蓝, 取出, 自来水洗。④镜检染色效果。⑤伊红染液内染色1 min后取出, 自来水洗。⑥镜检着色程度。⑦梯度乙醇浸洗。⑧切片吹干。⑨二甲苯透明。⑩中性树胶封固。

1.7 主要观察指标

形态学观察: 在建模后3, 7, 14, 21, 28, 56 d, 大体观察伤口愈合情况。

组织学观察: 每个时间点随机处死3只动物, 取术区标本制备组织学切片并行苏木精-伊红染色, 在光学

显微镜下观察术区炎性浸润、细胞增殖、血管和上皮形成等组织修复情况(图2)。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 纳入的18只实验兔, 其中因手术体位不良引起动物窒息死亡1只, 术中因追加麻药引起动物死亡1只。其他受试动物在整个实验周期中生长状况良好, 能够顺利耐受手术, 建模后未出现死亡现象。最终16只兔进入结果分析。造模流程图见图2。

2.2 建模后兔一般情况 动物麻醉后2–4 h苏醒, 开始活动, 自由进食、饮水。建模后动物活动未受影响, 生长发育良好, 食欲尚可, 体质量波动不大。

2.3 建模后兔创面一般形态观察结果 建模后3 d, 创口轻度收缩, 创缘红肿明显, 轻触出血, 创面基底见薄层新鲜肉芽组织及少量点状出血(图3A)。建模后7 d, 伤口收缩明显, 创面炎症情况好转, 但红肿仍明显, 创面基底逐渐被新生肉芽组织填充。随着时间推移, 创口炎症反应逐渐减轻, 创面收缩程度逐渐增大, 基底逐渐被黏膜上皮覆盖, 组织呈“凹陷性愈合”的现象(图3B)。完全愈合区的黏膜与正常组织在色泽、质地、形态等方面无显著区别, 但个别愈合区域见瘢痕形成。建模后28和56 d, 创面已完全愈合, 未见创口呈“凹陷”现象, 创面形态恢复欠佳, 瘢痕明显(图3C)。

2.4 建模后兔创面组织学变化 光学显微镜下观察: 建模后3 d, 创面表皮缺失, 皮下组织坏死、红染, 组织结构不清。皮下血管显著充血、水肿伴炎细胞浸润。皮下组织疏松、水肿、增宽, 结缔组织溶解, 残留组织形成网状结构, 多量嗜中性、嗜酸性粒细胞浸润, 坏死区域较大(图4A)。建模后7 d, 细胞修复开始, 可见结缔组织细胞增殖明显, 肉芽组织形成较好, 新生毛细血管可见(图4B)。建模后14 d, 新生肉芽组织向表面生长吞噬、溶解、消化、替代、清除坏死组织, 向表面推进, 大量创伤被结缔组织填充, 伤口坏死边缘填平, 此时尚残存有未完全修复创面(图4C)。建模后21, 28 d, 伤口基本修复, 角化完全, 基本无炎症反应, 创口表皮修复, 皮下结缔组织未完全修复。建模后56 d, 创面塑形完整, 可见皮下脂肪结缔组织、毛细血管和部分平滑肌组织, 其间偶见炎细胞, 属正常现象(图4D)。

3 讨论 Discussion

3.1 实验动物和造模方法的确立 国内外对于建立口腔软组织缺损的动物模型采用了不同的动物品种和不

同的造模方法。Cornelissen 等^[12]在 5 周龄雄性 Wistar 大鼠的硬腭黏膜上用直径为 3 mm 的组织穿孔器制备标准化圆形缺损的动物模型。有学者也在各自实验中选择雄性 Wistar 大鼠在硬腭黏膜制备相同大小($\Phi 3$ mm)的软组织缺损^[13-14]。罗恩等^[15]选择山羊作为实验对象, 在其硬腭中份切除 18 mm \times 14 mm 的矩形黏骨膜。朱慧颖等^[16]用手术刀切除大耳白兔上下切牙唇侧 2 mm 牙龈。Suaid 等^[17]利用外科手术手段在杂种狗口内制备 5 mm \times 7 mm 牙龈退缩动物模型。Thoma 等^[18]拔除 16 只小型猪双侧下颌双尖牙, 3 个月内在创面制备 8 mm \times 8 mm 缺损区, 以对比分析不同的生物材料对软组织(包括硬组织)再生的作用。实验选择新西兰兔作为实验对象, 主要取决于以下因素: ①该动物性情温顺, 易于饲养管理, 抗病能力较强。②兔的最大安全采血量为 10 mL^[21], 能够满足某些特殊实验需求(如需要一定的采血量)。③实验兔口内牙龈量有限, 不足以制备相当大小的缺损区, 而其硬腭黏膜与人口腔软组织的组织学结构类似^[23-24]: 表面均被覆角化的复层鳞状上皮, 上皮钉突明显; 固有层较厚, 主要由紧密排列的粗大的胶原纤维构成, 这在实验的组织学切片中得以证实。同时硬腭黏膜量充足, 又便于术区暴露、手术操作和建模后伤口的动态观察。④价格较经济。

参照以往研究的相关造模方式^[12-14], 此处实验在中国首次利用标准直径为 5 mm 的组织环切钻在实验兔硬腭前份制备软组织缺损, 而避免了使用手术刀、量尺等器械进行造模处理可能带来的误差和操作不便。同时, 由于术区在硬腭前份, 不仅避免了由于伤口靠后在术中可能因出血、呼吸不畅等导致动物死亡的风险, 而且该部位方便了手术入路, 充分暴露了术野, 更加易于操作和建模后伤口的动态观察。因此, 该模型制备方法容易掌握, 能够缩短造模时间, 降低动物死亡率, 其重复性佳, 稳定性好, 可控性强, 适合对较多数量实验动物口内伤口的修复机制及修复方法进行深入研究。

3.2 造模结果分析 实验从造模之后各时间点的形态学和组织学观察中证实, 实验兔口腔软组织创伤修复过程与人伤口愈合规律基本一致, 即包括炎症反应、细胞增殖和组织重建 3 个紧密联系、环环相扣的阶段^[25-26], 并且伤口愈合过程与人口腔软组织缺损的愈合特点相似^[24], 正面印证了该实验模型很好地复制了人类口腔软组织缺损愈合的特征, 具有一定的转化医学意义。

实验选择的时间节点跨度较大, 间隔时间稍长, 众所周知创伤愈合一些重要环节的变化在建模后早期是很显著的, 如反应伤口炎症情况的有关致炎因子(肿瘤坏

死因子 α , 白细胞介素 1, 6 等)在建模后 1, 3, 5, 7 d 的表达是呈动态的^[27]; 建模后 3, 7, 11, 15 d 能很好地分别代表炎症早期, 炎症晚期/增生早期, 增生晚期和塑形早期 4 个创伤愈合过程中具有典型变化的阶段^[16]。此外, 很多与血管生成相关的生长因子的释放具有时间性, 如血管内皮生长因子表达于损伤后即刻, 在 12 h 增强, 24-48 h 表达最强^[28]; 成纤维细胞生长因子的量在伤后创口局部分泌液中立即升高, 约 8 d 开始显著表达, 并在 12-14 d 达到高峰^[29-31]。实验主要着眼于较长期观察创伤愈合过程的同时并没有对伤口在建模后早期(15 d 以内)的观察时间节点进行细化处理, 这样就可能使实验不能及时获得反映这些时段伤口微观变化的重要信息, 这在今后的研究中应该进一步完善。

综上所述, 实验成功建立了新西兰兔口腔软组织缺损动物模型, 符合动物造模应遵循的设计原则, 对后续的实验设计和研究探索奠定了基础, 而且对实验从细胞、分子乃至基因水平研究创伤修复机制将产生积极的影响。由于在不同的研究领域, 因学科类别、实验目的、方法等的不同, 而在实验动物选择和口腔软组织缺损动物模型方法的确立方面各学科有不同的考量。因此, 实验要结合各自学科的特点和不同的研究内容, 合理选择适合各自科研条件、要求的实验动物和造模方法。

致谢: 感谢四川大学华西医院动物中心、四川省医学科学院·四川省人民医院药物安全评价中心病理室和中国人民解放军成都军区机关医院口腔科的老师们对实验给予的技术支持和指导意见。

作者贡献: 孙勇、陈红亮和杨琴秋精心设计了实验。杨琴秋负责模型制备、资料收集、实验评估和成文。孙勇和陈红亮审校。董露和肖琼协助动物实验的完成。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。



图1 实验动物口腔内软组织缺损模型的建立
Figure 1 Establishment of experimental animal models of oral soft tissue defects
图注: 图A为造模前动物口内形态; B为制备的口腔软组织缺损动物模型; C为取下的直径为5 mm的硬腭软组织。

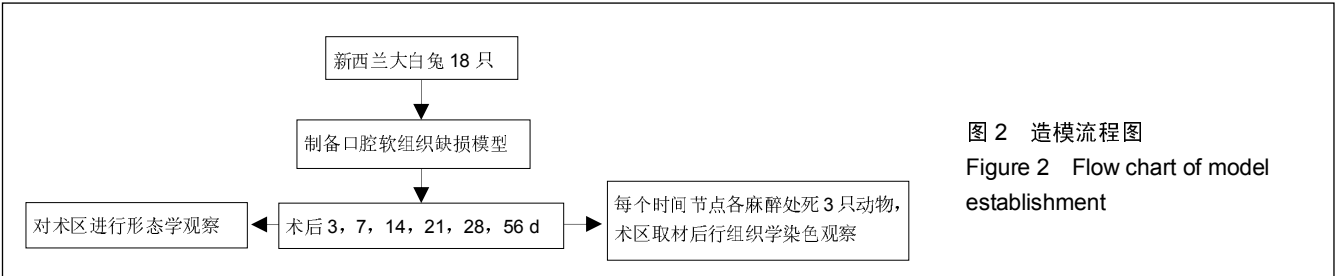


图2 造模流程图
Figure 2 Flow chart of model establishment

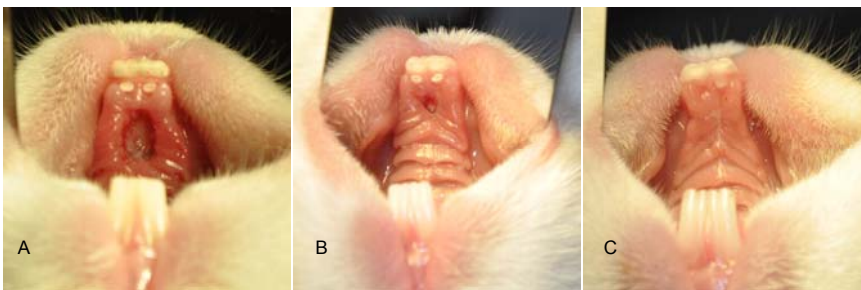


图3 动物口内伤口在建模后3, 14, 28 d的愈合情况
Figure 3 Healing of the wound in the animal's mouth on days 3, 14 and 28 after the surgery
图注: 图A显示在建模后3 d, 创面炎症反应明显; B显示在建模后14 d, 创面呈“凹陷性愈合”的现象; C显示在建模后28 d, 创面完全闭合, 瘢痕明显。

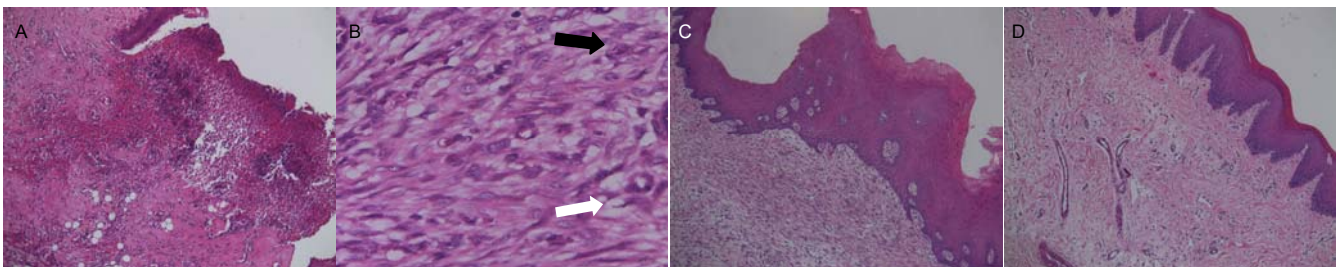


图4 建模后3, 7, 14, 56 d创面组织形态(苏木精-伊红染色)
Figure 4 Morphology of wound on days 3, 7, 14 and 56 after the surgery (hematoxylin-eosin staining)
图注: 图A示建模后3 d, 炎症细胞浸润明显($\times 100$); B为建模后7 d, 结缔组织细胞增殖(黑色箭头), 新生血管广泛(白色箭头; $\times 400$); C为建模后14 d, 伤口被结缔组织填充, 但残存有未完全修复创面($\times 100$); D为建模后56 d, 组织修复完全($\times 100$)。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Levine RA, Huynh-Ba G, Cochran DL. Soft tissue augmentation procedures for mucogingival defects in esthetic sites. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29 Suppl:155-185.
- [2] Zucchelli G, Mazzotti C, Mounssif I, et al. A novel surgical-prosthetic approach for soft tissue dehiscence coverage around single implant. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24(9):957-962.
- [3] Sicilia A, Quirynen M, Fontollet A, et al. Long-term stability of peri-implant tissues after bone or soft tissue augmentation. Effect of zirconia or titanium abutments on peri-implant soft tissues. Summary and consensus statements. The 4th EAO Consensus Conference 2015. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26 Suppl 11:148-152.
- [4] Landsberg CJ. The eversed crestal flap: a surgical modification in endosseous implant procedures. *Quintessence Int*. 1994;25(4):229-232.
- [5] Penarrocha-Diago M, Gomez-Adrian MD, Balaguer-Martinez J, et al. Mandibular connective tissue pedicle flaps in implant dentistry: report of three cases. *J Oral Implantol*. 2007;33(3):127-132.

- [6] Jantsch HH, Kempainen P, Ringler R, et al. Cortical representation of experimental tooth pain in humans. *Pain*. 2005;118(3):390-399.
- [7] Vignoletti F, Nunez J, Sanz M. Soft tissue wound healing at teeth, dental implants and the edentulous ridge when using barrier membranes, growth and differentiation factors and soft tissue substitutes. *J Clin Periodontol*. 2014;41 Suppl 15:S23-S35.
- [8] Rigby MH, Taylor SM. Soft tissue reconstruction of the oral cavity: a review of current options. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013;21(4):311-317.
- [9] 胡开进,王新木,侯锐,等.异种脱细胞真皮基质的研究进展及其在口腔黏膜缺损中的应用[J].中华损伤与修复杂志(电子版),2007,(3):173-175.
- [10] Sculean A, Mihatovic I, Shirakata Y, et al. Healing of localized gingival recessions treated with coronally advanced flap alone or combined with either a resorbable collagen matrix or subepithelial connective tissue graft: a preclinical study. *Clin Oral Investig*. 2015;19(4):903-909.
- [11] Missana LR, Jammal MV. Critical size defect regeneration by rhPTH-collagen membrane as a new tissue engineering tool. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(12):4358-4364.
- [12] Cornelissen AM, Maltha JC, Von den Hoff JW, et al. Local injection of IFN-gamma reduces the number of myofibroblasts and the collagen content in palatal wounds. *J Dent Res*. 2000;79(10):1782-1788.
- [13] 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,(11):1388-1391.
- [14] 张亚军,杨聪翀,刘来奎,等.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.
- [15] 罗恩,余兰,郑谦,等.n-HA/PA66人工骨板引导修复腭部软组织缺损的动物实验研究[J].上海口腔医学,2004,(5):389-392.
- [16] 朱慧颖,车彦海,何畔,等.重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子对兔牙龈创伤愈合的促进作用[J].吉林大学学报(医学版),2014,(6):1206-1209.
- [17] Suaid FF, Carvalho MD, Santamaria MP, et al. Platelet-rich plasma and connective tissue grafts in the treatment of gingival recessions: a histometric study in dogs. *J Periodontol*. 2008;79(5):888-895.
- [18] Thoma DS, Halg GA, Dard MM, et al. Evaluation of a new biodegradable membrane to prevent gingival ingrowth into mandibular bone defects in minipigs. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(1):7-16.
- [19] Shirakata Y, Eliezer M, Nemcovsky CE, et al. Periodontal healing after application of enamel matrix derivative in surgical supra/infrabony periodontal defects in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Periodontol Res*. 2014;49(1):93-101.
- [20] Chen Y, Niu Z, Xue Y, et al. Improvement in the repair of defects in maxillofacial soft tissue in irradiated minipigs by a mixture of adipose-derived stem cells and platelet-rich fibrin. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014;52(8):740-745.
- [21] 刘恩岐,尹海林,顾为望.医学实验动物学[M].北京:科学出版社,2008.
- [22] 王芳.PRF与纳米羟基磷灰石植入对兔拔牙创牙槽嵴保存影响的实验研究[D].济南:山东大学,2013.
- [23] 王志勇,石冰,鲁大为,等.颊、腭粘膜移植修复硬腭裸露骨面的组织学观察[J].华西口腔医学杂志,2002,(5):326-329.
- [24] 宿玉成.现代口腔种植学[M].北京:人民卫生出版社,2004.
- [25] Kurosaka M, Suzuki T, Hosono K, et al. Reduced angiogenesis and delay in wound healing in angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *Biomed Pharmacother*. 2009;63(9):627-634.
- [26] 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.
- [27] Shi J, Xi W, Yi C, et al. Vacuum sealing drainage promotes experimental pig explosive abdomen wound healing. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2014;30(3):312-315.
- [28] 周建清,王永忠,胡治国,等.大鼠创伤皮肤内血管内皮生长因子表达的免疫组化研究[J].江苏大学学报(医学版),2003,(5):46-47.
- [29] Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, et al. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*. 2009;153(2):347-358.
- [30] Kibe Y, Takenaka H, Kishimoto S. Spatial and temporal expression of basic fibroblast growth factor protein during wound healing of rat skin. *Br J Dermatol*. 2000;143(4):720-727.
- [31] Shukla A, Dubey MP, Srivastava R, et al. Differential expression of proteins during healing of cutaneous wounds in experimental normal and chronic models. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;244(2):434-439.