

[文章编号] 1671-587X(2024)02-0556-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240232

角化龈形成机制及增量移植材料的研究进展

石雅茹, 杨庆祎, 徐晓薇

(吉林大学口腔医院牙周科, 吉林 长春 130021)

[摘要] 角化龈对于维持牙周组织健康有重要意义, 但其具体形成机制目前尚不十分明确。口腔上皮细胞的分化由基因决定, 同时上皮结缔组织和牙周膜也会影响上皮的类型, 其中上皮结缔组织中的弹性纤维对于维持上皮的表型起重要间接作用。由于形成机制不明, 目前角化龈增量的主要治疗方法是膜龈手术, 使用的移植材料包括自体组织 (游离龈移植、上皮结缔组织移植和自体血小板浓缩物等)、异体材料 (脱细胞真皮基质、异种胶原基质和羊膜等) 以及两者结合而成的组织工程制品 (以层状壳聚糖或纳米纤维水凝胶复合材料为支架的组织工程制品)。现从牙龈角化过程、角化决定因素和现有的移植材料进行综述, 总结目前在牙龈角化机制及角化龈增量材料方面的研究进展, 为进一步的机制研究及新型材料的开发提供依据。

[关键词] 角化龈; 上皮结缔组织; 细胞分化; 牙周软组织再生; 移植材料

[中图分类号] R781.4 [文献标志码] A

Research progress in formation mechanism of keratinized gingiva and incremental transplant material

SHI Yaru, YANG Qingyi, XU Xiaowei

(Department of Periodontics, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT Keratinized gingiva plays an important role in maintaining the health of the periodontal tissue, however, the specific mechanism of its formation is not fully understood. The differentiation of oral epithelial cells is determined by genetics, but the type of epithelium is also influenced by the underlying connective tissue and periodontal ligament, and the elastic fibers in the connective tissue has an important indirect effect on maintaining the epithelial phenotype. Due to the unclear formation mechanism, the primary treatment method for augmenting keratinized gingiva is currently mucogingival surgery, and the employing graft materials included autogenous tissues (free gingival grafts, subepithelial connective tissue grafts, and autologous platelet concentrates, etc), allogeneic materials (acellular dermal matrix, xenogeneic collagen matrix, and amniotic membrane, etc.) and the combination of these in the form of tissue-engineered products (using layered chitosan or nanofiber hydrogel composite materials as scaffolds). This review covers the keratinization process of the gingiva, the factors determining keratinization, and the existing graft materials, summarizes the current research advancements in gingival keratinization mechanism and materials for gingival augmentation, and provides the basis for the further mechanism research and the

[收稿日期] 2022-12-25

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81970946); 吉林省科技厅自然科学基金项目 (20200201611JC); 吉林大学学科交叉融合创新项目 (JLUXKJC2021QZ09); 吉林大学白求恩计划项目 (2020B43)

[作者简介] 石雅茹 (1999-), 女, 内蒙古自治区呼和浩特市人, 在读硕士研究生, 主要从事牙周软组织再生方面的研究。

[通信作者] 徐晓薇, 教授, 副主任医师, 博士研究生导师 (E-mail: xiaoweixu@jlu.edu.cn)

development of new materials.

KEYWORDS Keratinized gingiva; Subepithelial connective tissue; Cell differentiation; Gingival soft tissue regeneration; Graft material

游离龈和附着龈合称为角化龈, 其表面存在角化层, 并且含有神经酰胺、胆固醇及游离脂肪酸等, 这些物质可作为上皮屏障功能的基础, 阻止有毒物质的渗透以保护底层组织^[1]。角化龈的根方是无角化层的牙槽黏膜, 易形成黏膜创伤, 具有移动性, 自洁能力差, 易造成菌斑堆积; 且牙槽黏膜表面神经酰胺含量少, 渗透性较高^[2]。角化龈能抵抗咀嚼摩擦力, 有利于局部菌斑控制^[3], 因此天然牙^[4]及种植体^[3]周围角化龈缺乏的部位多与菌斑滞留、组织炎症、牙龈退缩以及附着丧失有关。研究^[4]显示: 至少需要2 mm宽度的角化组织以维持牙周健康, 对于角化龈不足的患者临床上应密切观察, 必要时进行手术治疗。

角化龈和非角化黏膜结构的不同主要来源于分化差异, 许多研究者^[5-7]对角化龈的分化模式进行了探讨, 发现上皮细胞及周围组织均对角化龈的形成有一定影响。由于具体分化模式尚不清楚, 因此目前临床上仍使用移植术治疗角化龈不足, 使用的移植材料包括自体组织、异体材料和组织工程学制品, 但上述材料均存在一定的缺点。目前国内外研究和报道多集中于引起角化龈不足的因素以及开发应用新型角化龈增量移植材料, 对角化龈形成机制的研究较少, 针对角化龈形成机制设计合成的材料或药物也较少, 现就角化龈形成机制的研究近况及现有的移植材料进行综述, 旨在从自体组织形成机制的角度为增量移植材料和角化龈再生的研究提供参考。

1 牙龈角化的过程

角化龈由深至浅可分为4层: 基底层、棘层、颗粒层和角化层。位于角化上皮基底层的角质形成细胞在向表面迁移的过程中发生改变, 主管代谢的细胞器逐渐减少, 而角质形成产物逐渐累积。在颗粒层中存活的角质形成细胞转化为表面角质层中的死细胞, 这些死细胞胞内无细胞器且充满角蛋白丝, 这一过程称为角化。在非角化上皮中, 颗粒层被表层所取代, 表层细胞缺乏角化透明颗粒, 不发生角化^[8]。

从分子生物学的角度, 角化由整合素 $\beta 1$ 和角质形成细胞——干细胞中的p63转录因子启动^[9-10],

角化过程中细胞内的角蛋白逐渐增多并与丝聚合蛋白相互作用形成致密的支架结构, 兜甲蛋白、内披蛋白和小富脯蛋白等在细胞膜内侧沉积, 待细胞膜分解后, 通过转谷氨酰胺酶的交叉连接作用, 形成稳定耐摩擦的角化包膜。其中角蛋白可作为一种区分上皮细胞不同分化类型的有效标记, 在基底层中角化上皮和非角化上皮均表达K5/14; 而在基底上细胞层中, 角化上皮主要表达K1/10和K6/16, 非角化上皮主要表达K4/13^[11]。角化过程中核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB) 依赖的抗凋亡蛋白表达水平升高, 以保护细胞的角化过程不受经典凋亡途径影响^[12]。角化上皮和非角化上皮发生这一分化差异的机制仍有待阐明, 多数研究者^[5-6, 13]认为与上皮细胞内部和外部因素有关。

2 角化龈形成的决定因素

鉴于角化龈对牙周健康的重要作用, 探讨上皮细胞的分化模式具有重要意义。决定角化上皮和非角化上皮分化模式的是上皮细胞还是其周围组织, 针对这一问题不同研究^[5, 7]的结果存在差异, 主要观点是上皮细胞和周围组织均参与了角化龈的形成。

2.1 上皮细胞

有研究者^[5]发现口腔上皮即使离开原始部位, 还能够保留原始组织的形态特征, 因此认为口腔上皮细胞的分化程序是由基因决定的固有特性。采用方法为将取自硬腭的上皮细胞放置在胶原凝胶上进行体外培养, 达到一定体积后移植于口内黏膜联合根方的非角化黏膜区域, 发现新形成的上皮在角质层形态和角化特异性标记角蛋白K1的表达上都与原始供体部位相同。还有研究^[6]显示: 口腔上皮细胞即使在不同来源的间充质上培养, 也不会影响口腔上皮的分化程序。综上, 口腔上皮细胞可能具有内在的、位点特异性的, 且独立于受植区影响的分化程序, 这一特性也是在角化龈增量手术中选择自体角化黏膜作为移植物的基础。

2.2 周围组织

2.2.1 上皮下结缔组织 有研究者^[14]认为: 虽然口腔上皮细胞的分化独立于受植区的影响, 但是受植区对于移植上皮的表型也有一定作用。

MACKENZIE等^[13]在小鼠体内进行了多次上皮结构重组实验,发现当不存在上皮下结缔组织或仅存在其他非上皮下结缔组织(肌肉和肌腱)时,移植的单层上皮几乎不能在受体部位存活。当硬腭上皮细胞在体外培养于胶原凝胶上时,不能形成角化层,也不能表达角化上皮特异性角蛋白K1;只有在移植到口内后,才能发生正常的角化^[5]。上述研究证实体外培养环境不足以使角质形成细胞分化完全,上皮下结缔组织在促进上皮细胞成熟方面具有重要作用。

结缔组织具有促进上皮细胞成熟的作用,还具有影响上皮类型的作用。KUMAR等^[7]研究了游离腭骨瓣植入口内后新形成的上皮,发现其蛋白质表达模式与口腔角化上皮相似,而非口外移植的皮肤,这些移植的角质形成细胞改变了移植物的性质以适应受体部位的环境。KARRING等^[14]将分别取自角化上皮与非角化上皮的上下结缔组织移植到非角化黏膜下,并在受植区表面进行去掉原上皮的暴露处理,待表面上皮重建完成后,显示植入非角化上皮下结缔组织的受植区表面均形成了非角化上皮;而植入角化上皮下结缔组织的14个受植区中有10个受植区形成了角化上皮,结果证实了上皮分化差异是由其下层结缔组织所决定的,由牙槽黏膜上皮下结缔组织增殖的肉芽组织将形成非角化黏膜;而由牙龈上皮下结缔组织或牙周膜增殖的肉芽组织将形成角化黏膜^[15],因此膜龈手术角化龈增量的效果取决于再生组织的起源。

为进一步区分影响上皮分化的结缔组织是位于结缔组织中的浅层还是深层,OUHAYOUN等^[16]将取自角化上皮的厚移植体分为2个较薄的部分,一部分包括角化上皮层和浅层结缔组织,另一部分为深层结缔组织,将两部分分别移植到缺乏角化龈的部位,角蛋白的检测结果显示:移植了深层结缔组织的6例受植区中只有2例形成了类似于角化上皮的再生组织,但同时其也存在非角化上皮的特征。由此确定浅层结缔组织能够影响上皮分化,尚不能认为深层结缔组织具有诱导非角化上皮细胞发生角化的潜力。

研究^[14]发现:角化和非角化上皮结缔组织的差别之一是其弹性纤维的含量,角化上皮中与血管相关的弹性纤维较少,而非角化上皮中弹性纤维数量多且分布均匀。为验证弹性纤维是否影响分化,HSIEH等^[17]在角化和非角化口腔黏膜体外培养物

中分别加入外源性弹性纤维及弹性纤维酶检测特异性角蛋白,发现弹性纤维数量的减少可导致非角化上皮开始表达角化上皮特异性角蛋白K1/10,而非角化上皮经外源性弹性蛋白处理后表达非角化上皮特异性角蛋白K4/13,结果显示弹性纤维对于维持非角化上皮的表型起重要间接作用,但其上游和下游分子机制仍不清楚。

2.2.2 牙周膜组织 虽然上皮下结缔组织对上皮细胞的分化有重要影响,但这种影响可能是有限的。LINARES等^[18]采用动物实验对比天然牙与种植体周围角化龈再生的情况,研究者将天然牙颊侧角化上皮切除,保留上皮下结缔组织,并将根方的非角化黏膜冠状复位,结果显示在天然牙颊侧会自发形成新角化龈,这与KARRING等^[14]的实验结果一致。而当将天然牙和种植体颊侧角化龈全部切除后,天然牙在没有上皮下结缔组织的情况下同样会自发形成新角化龈,而种植体周围没有角化龈形成。与天然牙相比,种植体周围不存在牙周膜结构,因此提示牙周膜可能在诱导新角化龈形成中发挥一定作用。此外,该研究者在切除种植体颊侧全部角化龈后,又移植了取自角化龈的上皮下结缔组织,结果显示:6个种植体周围仅有2个表现为有角化组织形成,因此认为,牙周膜可能也参与诱导角化龈形成的过程,且在没有基线角化龈存在的情况下,上皮下结缔组织本身不能诱导新角化龈形成。

综上,上皮细胞的分化由基因决定,但也可能受到上皮下结缔组织和牙周膜的影响。上皮下结缔组织是促进上皮生长和成熟所必需的,可能还会影响上皮的类型。对于角化龈的再生,受植区必须存在一定量的基线角化龈,结缔组织才能诱导形成新角化龈。因此通过移植术进行角化龈增量时,自体组织一般采用取自上颌腭侧、上颌结节区和缺牙区牙槽嵴等部位的角化黏膜或上皮下结缔组织;组织工程制品使用的种子细胞也是取自腭部或口腔内其他角化部位的角质形成细胞,以保证移植体进行角化龈增量的有效性。

3 移植材料

为解决角化龈量不足而引起的菌斑堆积、舒适度差和美学效果不佳等问题,目前临床上常采用膜龈手术增加附着龈宽度。术中常用的移植材料根据来源可分为自体组织、异体材料和组织工程制品。

3.1 自体组织

3.1.1 游离龈移植术(free gingival graft, FGG)和上皮下结缔组织移植术(subepithelial connective tissue graft, SCTG) FGG指将自体健康的角化组织全层移植到缺乏角化龈的部位, 而SCTG采用的移植物是上皮下结缔组织。FGG和SCTG最突出的优点是角化龈增量明显, 两者均被视为治疗牙龈退缩的“金标准”, 且SCTG在角化龈增厚和美学效果方面更具优势^[19-21]。

尽管临床效果极佳, FGG和SCTG也存在多个手术区造成的术后疼痛、肿胀和出血等并发症, 这些并发症在FGG中发生率最高, 其次为SCTG^[22]。为解决上述不足, 研究者提出了许多新的治疗手段, 如术中使用改良显微外科隧道技术^[23]、移植物使用促红细胞生成素处理^[24]、受植区使用乙二醇四乙酸处理^[25]、受植区经铟、铬: 铒 钪 镱 石榴石 (erbium, chromium: yttrium scandium gallium garnet laser, Er, Cr: YSGG) 激光照射^[26]和根面覆盖透明质酸^[27]等, 上述方法均能在一定程度上促进愈合, 减轻术后疼痛。

FGG和SCTG的另一缺点是可用组织量有限, 由于常选用的供体组织限于上颌前磨牙至第一磨牙腭侧角化牙龈, 无法满足大面积角化龈缺损移植的需求。有研究者提出使用患者已有的锥形束计算机断层扫描 (cone-beam computed tomography, CBCT) 数据, 创建个性化软组织3D模型, 该方法可在术前精确设计采集组织位置^[28], 更合理地利用供区组织; 还有研究者使用取自颊脂肪垫中的自体脂肪组织作为游离移植物, 也取得了改善牙龈退缩的疗效^[29]。

FGG和SCTG操作难度大, 移植组织切取及受植区缝合技术要求高。为降低手术难度, 有研究者开发出能替代可吸收缝线的组织粘接剂, 如氰基丙烯酸酯组织粘接剂^[30], 其能够保证组织愈合初期的稳定性, 降低手术难度。

3.1.2 自体血小板浓缩物 (autologous platelet concentrates, APCs) 除FGG和SCTG外, APCs也可用于角化龈增量的自体移植材料。APCs由静脉血通过密度梯度离心制成, 根据使用技术的不同, 可得到富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP)、富血小板纤维蛋白 (platelet-rich fibrin, PRF) 和浓缩生长因子 (concentrated growth factor, CGF)。APCs含有大量生长因子, 有促进

再生的潜力和良好的生物相容性^[31]。其中PRF由于成本低、更易操作且不添加抗凝血剂或牛凝血酶, 广泛应用于口腔组织再生^[32]。有研究者使用低速离心技术制备出可注射的PRF, 更符合微创理念, 并且其在保持液体状态15 min后会形成凝块^[33], 在2周内持续释放生长因子^[34], 但其长期效果有待进一步验证, 目前多作为促进角化龈再生的一种辅助治疗手段, 与异体材料的移植同期进行。

3.2 异体材料

虽然FGG和SCTG长期以来都被视为角化龈增量的“金标准”, 但由于存在组织量有限及术后反应重等弊端, 研究者一直在寻找可用于角化龈再生的异体替代材料。目前临床上常用的异体材料多为多孔三维结构, 需配合冠向复位瓣使用, 其多孔结构有利于自体细胞长入形成血管化组织, 待材料降解后形成永久性的新组织。因此应用于临床的异体材料应具有良好的生物相容性、稳定的机械性能以及可降解的特性^[35]。

3.2.1 脱细胞真皮基质 (acellular dermal matrix, ADM) ADM的原料为人类异体皮肤, 在不改变细胞外基质结构和基底膜复合体的条件下, 将表皮和真皮细胞移除制成的基质支架^[36]。ADM最早应用于烧伤的治疗, 商品名为AlloDerm[®], 因其具有良好的临床效果, 被引入口腔组织再生。有研究^[37-38]发现ADM短期内角化龈增量效果类似于SCTG, 且移植材料不受限, 美学效果优于FGG; 但存在长期效果不稳定和收缩率大的缺点。

3.2.2 异种胶原基质 (xenogeneic collagen matrix, XCM) XCM是猪源性的I型和III型胶原蛋白经过提纯加工得到的双层胶原基质, 商品名为Mucograft[®]。XCM一面为光滑低孔隙率的致密层, 具有弹性, 可缝合到受植区黏膜边缘; 另一面为多孔的三维海绵层, 有利于血管化和组织结合, 有利于伤口愈合^[39]。有研究对比了SCTG与XCM软组织增量的有效性和美学效果, 结果显示: XCM可有效增加角化龈量^[40], 且移植后边缘组织质地和边缘轮廓较好^[41]; 但角化龈增厚效果和龈缘位置的美学评分不及SCTG。此外, 还有研究^[42]发现XCM的上清液和裂解物会引起牙龈成纤维细胞中转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 信号通路的激活, 使其在软组织增量的同时还可能对骨再生起到积极作用。

3.2.3 羊膜(amniotic membrane, AM) AM是包围和保护胚胎的羊膜囊的最内层,包含表皮生长因子、转化生长因子 α (transforming growth factor alpha, TGF- α)、TGF- β 、成纤维细胞生长因子2和角质形成细胞生长因子等,具有免疫调节、抗炎、抗病毒、抗菌、镇痛和抗瘢痕等特性^[43]。AM常用于角膜上皮缺损的治疗,近年来开始应用于口腔组织再生。研究^[44]显示:脱水AM与冠向复位瓣术联合使用治疗牙龈退缩,与单独使用冠向复位瓣比较,加入AM移植物可以在一定程度上增加牙龈厚度,有助于移植后龈缘位置的维持。但目前AM的临床应用较少,且具有潜在的疾病传播风险。

异体材料解决了FGG和SCTG多个术区的问题,降低术后疼痛发病率,缩短手术时间;还具有优良的美学效果,有研究发现使用异体材料获得的美学效果优于FGG,与SCTG的美学效果相当^[45];在患者需要大面积移植但自体角化组织不足时,使用替代材料是唯一的选择^[45]。但异体材料仍难以达到FGG和SCTG的疗效;同时异体材料的应用也存在一些缺点,如可用量有限、存在批次差异和材料表现出的物理性质有限^[8],且使用异体材料还会造成额外的材料费用。

3.3 组织工程制品

组织工程制品是一种新型的皮肤黏膜替代物,其使用自体细胞,分离、培养和接种在天然或合成支架材料上,在体外构成三维皮肤黏膜替代物,常用于移植手术或体外模型研究。

3.3.1 临床应用 组织工程化生产的皮肤黏膜最早应用于烧伤创面的移植,由于其临床效果良好,逐渐应用于口腔黏膜移植。GOLINSKI等^[46]使用牙龈成纤维细胞、角质形成细胞以及胶原-弹性蛋白基质,在体外培养出具有良好生物相容性的多层口腔黏膜。IZUMI等^[47]使用口腔角质形成细胞和ADM支架制备人工口腔黏膜,植入缺乏角化龈的部位后发现角化牙龈宽度增加了3 mm,厚度增加了1 mm。

3.3.2 新型支架材料 支架材料是组织工程制品的重要组成部分,选择具有理想孔隙率、降解速度和生物相容性的支架是构建组织工程制品的关键步骤^[8]。为获得合适的支架材料,许多研究者使用人工合成的异质材料作为组织工程支架,通过调整成分改变物理性质,以满足临床需要。

3.3.3 层状壳聚糖支架(lamellar chitosan scaffold, LCS) LCS是一种由纤维蛋白原和壳聚糖经双向冷冻法制备而成的具有多孔结构的仿生支架材料,有良好的机械性能和生物相容性,便于操作且能促进细胞附着和增殖,进而促进血管形成和软组织再生^[48]。此外,体外细胞共培养和体内动物实验^[49]结果均表明LCS可诱导巨噬细胞分化为M2巨噬细胞,还能促进胶原合成,有助于组织再生,但其临床效果还有待进一步实验验证。

3.3.4 纳米纤维水凝胶复合材料(nanofiber hydrogel composite, NHC) 纳米纤维和透明质酸水凝胶都被用作组织工程支架材料,但各自的机械性能有限,研究者^[50]将透明质酸水凝胶与聚己内酯纳米纤维交联,制成一种可注射的复合材料NHC;该材料能够模拟软组织细胞外基质,还富含趋化因子,能够促进宿主巨噬细胞浸润和血管生成反应。HENN等^[51]利用脂肪组织和NHC构建了血管化软组织,植入大鼠体内后观察发现移植物在21 d内转化为高度血管化的软组织,且未出现收缩的迹象。这种可注射性NHC与脂肪组织联合应用为组织工程制品的研发提供了一种新方法。

虽然组织工程制品有良好的临床效果,但由于生产设备限制、培养时间较长、方法较为复杂以及成本较高等问题,组织工程制品在角化龈增量的临床应用上受到限制。

4 展望

综上所述,现普遍认为角化龈的形成受基因、上皮下结缔组织和牙周膜等因素的共同作用。角化龈增量的金标准仍是FGG和SCTG,但存在术后反应重、组织量有限和操作难度大等缺点。可用于角化龈增量的替代材料种类多样,但均难以达到FGG和SCTG的效果。进一步研究角化龈的形成机制,从自体角化龈形成的角度出发,有望能开发出更有效的替代材料和药物,从而更好地实现角化龈增量。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

石雅茹负责文献检索和论文撰写,杨庆祎和徐晓薇负责论文修改。

[参考文献]

- [1] WERTZ P W. Roles of lipids in the permeability barriers of skin and oral mucosa[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(10): 5229.
- [2] WERTZ P W, COX P S, SQUIER C A, et al. Lipids of epidermis and keratinized and non-keratinized oral epithelia[J]. *Comp Biochem Physiol B*, 1986, 83(3): 529-531.
- [3] LIN G H, CHAN H L, WANG H L. The significance of keratinized mucosa on implant health: a systematic review[J]. *J Periodontol*, 2013, 84(12): 1755-1767.
- [4] LANG N P, LÖE H. The relationship between the width of keratinized gingiva and gingival health[J]. *J Periodontol*, 1972, 43(10): 623-627.
- [5] LUCA M D, ALBANESE E, MEGNA M, et al. Evidence that human oral epithelium reconstituted in vitro and transplanted onto patients with defects in the oral mucosa retains properties of the original donor site[J]. *Transplantation*, 1990, 50(3): 454-459.
- [6] KINIKOGLU B, ROVERE M R, HAFTEK M, et al. Influence of the mesenchymal cell source on oral epithelial development[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012, 6(3): 245-252.
- [7] KUMAR V V, JAMES B L, RUß M, et al. Proteome analysis reveals that de novo regenerated mucosa over fibula flap-reconstructed mandibles resembles mature keratinized oral mucosa [J]. *Oral Oncol*, 2018, 78: 207-215.
- [8] MOHARAMZADEH K, BROOK I M, VAN NOORT R, et al. Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature[J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1990, 1(3): 167-190.
- [9] LEVY L, BROAD S, DIEKMANN D, et al. beta1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms[J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(2): 453-466.
- [10] KOSTER M I, KIM S, MILLS A A, et al. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(2): 126-131.
- [11] DALE B A, SALONEN J, JONES A H. New approaches and concepts in the study of differentiation of oral epithelia[J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1990, 1(3): 167-90.
- [12] LIPPENS S, DENECKER G, OVAERE P, et al. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification[J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(Suppl 2): 1497-1508.
- [13] MACKENZIE I C, FUSENIG N E. Regeneration of organized epithelial structure [J]. *J Invest Dermatol*, 1983, 81(1): S189-S194.
- [14] KARRING T, LANG N P, LÖE H. The role of gingival connective tissue in determining epithelial differentiation[J]. *J Periodontol Res*, 1975, 10(1): 1-11.
- [15] KARRING T, OSTERGAARD E, LÖE H. Conservation of tissue specificity after heterotopic transplantation of gingiva and alveolar mucosa[J]. *J Periodontol Res*, 1971, 6(4): 282-293.
- [16] OUHAYOUN J P, SAWAF M H, GOFFLAUX J C, et al. Re-epithelialization of a palatal connective tissue graft transplanted in a non-keratinized alveolar mucosa: a histological and biochemical study in humans[J]. *J Periodontol Res*, 1988, 23(2): 127-133.
- [17] HSIEH P C, JIN Y T, CHANG C W, et al. Elastin in oral connective tissue modulates the keratinization of overlying epithelium[J]. *J Clin Periodontol*, 2010, 37(8): 705-711.
- [18] LINARES A, RUBINOS A, PUÑAL A, et al. Regeneration of keratinized tissue around teeth and implants following coronal repositioning of alveolar mucosa with and without a connective tissue graft: an experimental study in dogs: fifty years after Karring's landmark study: fifty years after Karring's 71 landmark study[J]. *J Clin Periodontol*, 2022, 49(11): 1133-1144.
- [19] THOMA D S, BURANAWAT B, HÄMMERLE C H F, et al. Efficacy of soft tissue augmentation around dental implants and in partially edentulous areas: a systematic review [J]. *J Clin Periodontol*, 2014, 41(Suppl 15): S77-S91.
- [20] DEEB G R, DEEB J G. Soft tissue grafting around teeth and implants[J]. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 2015, 27(3): 425-448.
- [21] CHAMBRONE L, BOTELHO J, MACHADO V, et al. Does the subepithelial connective tissue graft in conjunction with a coronally advanced flap remain as the gold standard therapy for the treatment of single gingival recession defects? A systematic review and network meta-analysis[J]. *J Periodontol*, 2022, 93(9): 1336-1352.
- [22] GRIFFIN T J, CHEUNG W S, ZAVRAS A I, et al. Postoperative complications following gingival augmentation procedures[J]. *J Periodontol*, 2006, 77(12): 2070-2079.
- [23] KARMAKAR S, KAMATH D S G, SHETTY N J, et al. Treatment of multiple adjacent class I and class II gingival recessions by modified microsurgical tunnel

- technique and modified coronally advanced flap using connective tissue graft: a randomized mono-center clinical trial[J]. *J Int Soc Prev Community Dent*, 2022, 12(1): 38-48.
- [24] YAGHOBE S, ROUZMEH N, TAHERI M, et al. Evaluation of topical erythropoietin application on the healing outcome of gingival graft recipient site; a randomized controlled clinical trial [J]. *BMC Oral Health*, 2021, 21(1): 578.
- [25] BAROOTCHI S, TAVELLI L, RAVIDÀ A, et al. Effect of EDTA root conditioning on the outcome of coronally advanced flap with connective tissue graft: a systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Oral Investig*, 2018, 22(8): 2727-2741.
- [26] RIPOLL S, FERNÁNDEZ DE VELASCOTARILONTE A, BULLÓN B, et al. Complications in the use of deepithelialized free gingival graft vs. connective tissue graft: a one-year randomized clinical trial[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18(9): 4504.
- [27] PILLONI A, SCHMIDLIN P R, SAHRMANN P, et al. Effectiveness of adjunctive hyaluronic acid application in coronally advanced flap in Miller class I single gingival recession sites: a randomized controlled clinical trial[J]. *Clin Oral Investig*, 2019, 23(3): 1133-1141.
- [28] SEIDEL A, SCHMITT C, MATTA R E, et al. Investigation of the palatal soft tissue volume: a 3D virtual analysis for digital workflows and presurgical planning[J]. *BMC Oral Health*, 2022, 22(1): 361.
- [29] KABLAN F K. The reliability of free buccal fat graft for treatment of severe gingival recessions at mandibular and maxillary exposed roots [J]. *Ann Maxillofac Surg*, 2018, 8(2): 281-286.
- [30] JEEVITHA M, PRABHAHAR C S, REDDY M, et al. Clinical evaluation of lateral pedicle flap stabilized with cyanoacrylate tissue adhesive: a randomized controlled clinical trial[J]. *Contemp Clin Dent*, 2022, 13(1): 24-29.
- [31] MIJIRITSKY E, ASSAF H D, KOLERMAN R, et al. Autologous platelet concentrates (APCs) for hard tissue regeneration in oral implantology, sinus floor elevation, peri-implantitis, socket preservation, and medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ): a literature review[J]. *Biology*, 2022, 11(9): 1254.
- [32] FARSHIDFAR N, JAFARPOUR D, FIROOZI P, et al. The application of injectable platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic scoping review of In vitro and In vivo studies[J]. *Jpn Dent Sci Rev*, 2022, 58: 89-123.
- [33] CHOUKROUN J, GHANAATI S. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept[J]. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 2018, 44(1): 87-95.
- [34] KYYYAK S, BLATT S, PABST A, et al. Combination of an allogenic and a xenogenic bone substitute material with injectable platelet-rich fibrin-A comparative *in vitro* study[J]. *J Biomater Appl*, 2020, 35(1): 83-96.
- [35] VACANTI J P, LANGER R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation [J]. *Lancet*, 1999, 354(Suppl 1): S132-S134.
- [36] WAINWRIGHT D. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns[J]. *Burns*, 1995, 21(4): 243-248.
- [37] HAPPE A, DEBRING L, SCHMIDT A, et al. Immediate implant placement in conjunction with acellular dermal matrix or connective tissue graft: a randomized controlled clinical volumetric study[J]. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2022, 42(3): 381-390.
- [38] CEVALLOS C A R, DE RESENDE D R B, DAMANTE C A, et al. Free gingival graft and acellular dermal matrix for gingival augmentation: a 15-year clinical study[J]. *Clin Oral Investig*, 2020, 24(3): 1197-1203.
- [39] HUANG J P, LIU J M, WU Y M, et al. Clinical evaluation of xenogeneic collagen matrix versus free gingival grafts for keratinized mucosa augmentation around dental implants: A randomized controlled clinical trial[J]. *J Clin Periodontol*, 2021, 48(10): 1293-1301.
- [40] ASHURKO I, TARASENKO S, ESAYAN A, et al. Connective tissue graft versus xenogeneic collagen matrix for soft tissue augmentation at implant sites: a randomized-controlled clinical trial [J]. *Clin Oral Investig*, 2022, 26(12): 7191-7208.
- [41] PELEKOS G, LU J Z, HO D K L, et al. Aesthetic assessment after root coverage of multiple adjacent recessions with coronally advanced flap with adjunctive collagen matrix or connective tissue graft: Randomized clinical trial[J]. *J Clin Periodontol*, 2019, 46(5): 564-571.
- [42] PANAHIPOUR L, KARGARPOUR Z, LUZA B, et al. TGF- β activity related to the use of collagen membranes: in vitro bioassays[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6636.
- [43] TOLEDANO M, TOLEDANO-OSORIO M, CARRASCO-CARMONA Á, et al. State of the art on biomaterials for soft tissue augmentation in the oral

- cavity. part I : natural polymers-based biomaterials[J]. *Polymers*, 2020, 12(8): 1850.
- [44] KUMAR S, HIRANI T, SHAH S, et al. Treating public health dilemma of gingival recession by the dehydrated amnion allograft : a 5-year longitudinal study[J]. *Front Oral Health*, 2020, 1: 540211.
- [45] MONTERO E, MOLINA A, MATESANZ P, et al. Efficacy of soft tissue substitutes, in comparison with autogenous grafts, in surgical procedures aiming to increase the peri-implant keratinized mucosa: a systematic review [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2022, 33(Suppl 23): 32-46.
- [46] GOLINSKI P A, GRÖGER S, HERRMANN J M, et al. Oral mucosa model based on a collagen-elastin matrix[J]. *J Periodontal Res*, 2011, 46(6): 704-711.
- [47] IZUMI K, NEIVA R F, FEINBERG S E. Intraoral grafting of tissue-engineered human oral mucosa[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2013, 28(5): e295-e303.
- [48] GHOLAP A D, ROJEKAR S, KAPARE H S, et al. Chitosan scaffolds: Expanding horizons in biomedical applications [J]. *Carbohydrate polymers*, 2024, 323: 121394.
- [49] FENG Y, GAO H L, WU D, et al. Biomimetic lamellar chitosan scaffold for soft gingival tissue regeneration[J]. *Adv Funct Materials*, 2021, 31(43): 2105348.
- [50] LI X W, CHO B, MARTIN R, et al. Nanofiber-hydrogel composite-mediated angiogenesis for soft tissue reconstruction [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(490): eaau6210.
- [51] HENN D, FISCHER K S, CHEN K, et al. Enrichment of nanofiber hydrogel composite with fractionated fat promotes regenerative macrophage polarization and vascularization for soft-tissue engineering [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2022, 149(3): 433e-444e.