

构建预制个性化骨瓣修复下颌骨缺损的灵长类动物模型

周苗^{1,2}, 彭歆², 车月娟³, 毛驰², 胡敏⁴, 俞光岩² (1广州医科大学附属口腔医院口腔颌面外科·口腔医学院·广州口腔疾病研究所, 广东省广州市 510140; 2北京大学口腔医院口腔颌面外科, 北京市 100081; 3中山大学孙逸仙纪念医院麻醉科, 广东省广州市 510120; 4解放军总医院口腔颌面外科, 北京市 100853)

文章亮点:

1 实验采用和人类最接近的恒河猴作为动物模型, 采用自体肌肉对组织工程骨进行促血管化, 待体内组织工程骨预制成功转移后修复下颌骨缺损, 并带蒂转移背阔肌内的预制的个性化、血管化组织工程骨瓣修复恒河猴下颌骨缺损, 目前还未见其他人报道, 本文阐述了该模型的制作方法和初步研究结果。

2 实验所用方法可避免常规组织工程培养的血管化困难、培养异体细胞产生免疫排斥和污染等问题。这种方法对于采用常规方法修复比较困难的二期骨缺损、放疗后血管条件差、自体供骨困难的患者具有较好的临床应用价值。

关键词:

实验动物; 组织构建; 颌骨缺损; 预制个性化骨瓣; 下颌骨重建; 人重组骨形态发生蛋白 2; 国家自然科学基金

主题词:

模型, 动物; 下颌骨折; 颌面假体; 钛; 骨形态发生蛋白质

基金资助:

国家自然科学基金(81000421); ITI 基金(0847_2012); 北京市科委重大项目(D090600704040291)

摘要

背景: 预制个性化骨瓣具有创伤小、血运好、可带软组织、形状可定制等优点, 可用于修复血管床欠佳的骨缺损。

目的: 建立预制骨瓣修复灵长类下颌骨缺损的动物模型。

方法: 对 9 只恒河猴进行头颅扫描并制作个性化钛网。将复合或者未复合人重组骨形态发生蛋白 2 的脱钙冻干骨、珊瑚装入个性化钛网, 植入背阔肌中进行个性化、血管化组织工程骨瓣的预制或者原位植入下颌骨节段性缺损。13 周时, 个性化、血管化组织工程骨瓣预制成功, 将其转移修复下颌骨节段型缺损。采用临床和组织学方法观察异位预制个性化骨瓣及原位植入人重组骨形态发生蛋白 2 修复下颌骨缺损的效果。

结果与结论: 预制骨瓣和原位植入的复合人重组骨形态发生蛋白 2 的珊瑚能修复下颌骨节段性缺损; 原位植入复合或未复合人重组骨形态发生蛋白 2 的脱钙冻干骨和单纯珊瑚不能修复下颌骨缺损。复合人重组骨形态发生蛋白 2 的脱钙冻干骨、珊瑚预制个性化、血管化组织工程骨瓣成功, 转移后均能成功修复下颌骨缺损, 而且修复下颌骨缺损的效果优于材料直接植入下颌骨缺损组。实验证实预制个性化骨瓣修复恒河猴下颌骨缺损模型是可行的。

周苗, 彭歆, 车月娟, 毛驰, 胡敏, 俞光岩. 构建预制个性化骨瓣修复下颌骨缺损的灵长类动物模型[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(18):2812-2817.

Establishment of a primate animal model of mandibular reconstruction with the prefabricated, customized bone flaps

Zhou Miao^{1,2}, Peng Xin², Che Yue-juan³, Mao Chi², Hu Min⁴, Yu Guang-yan² (1Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital ·School of Stomatology ·Research Institute of Stomatological Disease, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510140, Guangdong Province, China; 2Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Peking University School of Stomatology, Beijing 100081, China; 3Department of Anesthesiology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510140, Guangdong Province, China; 4Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract

BACKGROUND: Prefabricated customized bone flaps have the advantages of few trauma, good vascularization, ossification with predetermined shape, and can be used to restore bone defects with compromised blood bed.

OBJECTIVE: To establish animal models of mandibular reconstruction with prefabricated, customized bone flaps.

METHODS: After computed tomography scanning of nine rhesus' head, customized meshes were made. After loading with recombinant human bone morphogenetic protein-2-incorporated demineralized freeze-dried bone allograft (DFDBA) or coralline hydroxyapatite (CHA), the constructs were implanted in latissimus dorsi muscle. Meanwhile, segmental mandibular defects were created, and the customized meshes loaded with DFDBA, CHA,

周苗, 男, 1977 年生, 湖北省洪湖市人, 汉族, 2009 年北京口腔医学院毕业, 博士, 主治医师, 主要从事口腔种植、颌骨组织工程和相关生物材料的研究。

通讯作者: 俞光岩, 博士, 教授, 博士生导师, 北京大学口腔医院口腔颌面外科, 北京市 100081

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.18.005
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)18-02812-06

稿件接受: 2014-04-09

Zhou Miao, M.D., Attending physician, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital ·School of Stomatology ·Research Institute of Stomatological Disease, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510140, Guangdong Province, China; Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Peking University School of Stomatology, Beijing 100081, China

Corresponding author: Yu Guang-yan, M.D., Professor, Doctoral supervisor, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Peking University School of Stomatology, Beijing 100081, China

Accepted: 2014-04-09

or recombinant human bone morphogenetic protein-2-incorporated DFDBA and CHA were implanted *in situ*. At 13 weeks, prefabricated bone flaps with recombinant human bone morphogenetic protein-2-incorporated DFDBA or CHA were transferred to repair segmental mandibular defects. Clinical and histological analyses were used to evaluate the ossification and vascularization of the prefabricated implants in ectopic and orthotopic sites.

RESULTS AND CONCLUSION: Segmental mandibular defects were successfully restored with prefabricated bone flaps and recombinant human bone morphogenetic protein-2-incorporated CHA *in situ*, but other segmental mandibular defects remained with recombinant human bone morphogenetic protein-2-incorporated DFDBA, DFDBA and CHA *in situ*. Moreover, mandibles reconstructed with prefabricated bone flaps revealed more regenerated and homogeneous bone formation than other reconstructions. These findings suggest that the animal model of mandibular reconstruction with prefabricated, customized bone in rhesus monkey is applicable.

Subject headings: models, animal; mandibular fractures; maxillofacial prosthesis; titanium; bone morphogenetic proteins

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81000421; ITI Fund, No. 0847_2012; Key Project of Beijing Municipal Science & Technology Commission, No. D090600704040291

Zhou M, Peng X, Che YJ, Mao C, Hu M, Yu GY. Establishment of a primate animal model of mandibular reconstruction with the prefabricated, customized bone flaps. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(18):2812-2817.

0 引言 Introduction

口腔颌面部的肿瘤、外伤以及先天畸形常造成不同程度的颌骨缺损^[1-2]。自体骨移植、生物材料植入和牵张成骨是目前最常用的颌骨缺损修复方法^[3-5]。自体骨具有强骨诱导性、骨生成和骨传导佳等优点, 移植无免疫排斥, 是目前颌骨缺损修复的金标准。血管化自体骨移植如腓骨复合组织瓣移植是修复大段颌骨缺损的常用方法, 但具有损伤大、取骨量有限以及无法按照缺损形状进行三维预制等缺点^[6-8]。采用组织工程和个性化成型技术等新的颌骨缺损修复方法具有供区损伤小, 能根据缺损外形进行个性化定制等优点, 已成为目前的研究热点^[9]。

采用预制血管化组织工程骨修复颌骨缺损已经在临床上取得初步的成功。2004年, Warnke等^[10]采用成骨蛋白1复合BioOss[®]后, 用个性化钛网进行塑形, 在人背阔肌内预构个性化、血管化组织工程骨瓣, 待预制骨成熟后转移修复口腔颌面部肿瘤根治术后遗留的长约7 cm下颌骨缺损。2006年, Heliotis等^[11]报告采用骨生成蛋白1和珊瑚-羟基磷灰石(coral hydroxyapatite, CHA)复合后植入胸大肌中, 带蒂转移修复大段的下颌骨缺损。这些研究表明, 采用组织工程的方法进行颌骨重建已经从实验室过渡到临床应用的阶段。Terheyden等报道了采用预制组织工程骨修复人和小型猪下颌骨缺损的研究, 鲜有报道采用灵长类动物模型进行的该项实验研究^[10, 12-17]。恒河猴与人类结构基本类似, 其动物实验结果可靠性高, 对临床转化具有很大的参考价值^[17-20]。实验报告作者构建预制个性化骨瓣修复下颌骨缺损恒河猴模型的经验, 为下一步的研究打下基础。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 动物实验, 建模观察。

时间及地点: 实验于2007年5月至2009年2月在301医院动物实验中心完成。

材料:

动物: 恒河猴9只, 雄性, 健康, 年龄6-8岁, 体质量

7-11 kg, 购于北京协尔鑫生物资源研究所, 实验动物许可证号: SXCK(京)2010-0007, 所有的动物均通过检疫合格。根据国家实验动物管理条例的规定来实施动物实验, 并得到北京大学医学部伦理委员会的批准。

主要药品及仪器: 人重组骨形态发生蛋白2(recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2)由华东制药基因研究所采用大肠杆菌生产, 其纯度> 98%。人重组骨形态发生蛋白2由杭州远方生物技术有限公司提供。珊瑚-羟基磷灰石由北京易华健商贸公司提供; 脱钙冻干同种异体骨(demineralized freeze-dried bone allografts, DFDBA)是用恒河猴的四肢骨加工而成, 由山西奥瑞生物材料有限公司负责制作。

方法:

人重组骨形态发生蛋白2和载体的复合: 分别采用珊瑚-羟基磷灰石(CHA)和脱钙冻干同种异体骨(DFDBA)作为载体, 载体的大小分为两种, 尺寸有A、B两种, 每个钛网内放置A、B各2块。A的下表面为10 mm×3 mm、上表面为10 mm×6 mm、高度为5 mm, 放在钛网内的底部; B的尺寸为10 mm×5 mm×6 mm, 放置在A的上方。A、B材料各30块。

用明胶包裹方法, 将人重组骨形态发生蛋白2复合到珊瑚-羟基磷灰石和脱钙冻干同种异体骨。每块载体材料加入1.5 mg人重组骨形态发生蛋白2; 每个钛网内植入4块复合人重组骨形态发生蛋白2的载体材料, 即每个骨缺损放入6 mg的人重组骨形态发生蛋白2; 缺损体积按照20 mm×15 mm×10 mm计算, 植入的人重组骨形态发生蛋白2质量浓度为2 g/L(缺损体积)。另将脱钙冻干同种异体骨和珊瑚-羟基磷灰石进行相同的复合, 但不加入人重组骨形态发生蛋白2, 制备成对照组。按照上述方法复合的这4种材料称为DFDBA-BMP-2、CHA-BMP-2、DFDBA和CHA。

实验分组: 按照下颌骨缺损的修复方法, 分预制组(P-DFDBA-BMP, P-CHA-BMP, P-DFDBA和P-CHA)和

原位组(S-DFDBA-BMP, S-CHA-BMP, S-DFDBA和S-CHA)。在预制组,在背阔肌中预构个性化骨瓣,个性化钛网加载DFDBA-BMP-2和CHA-BMP-2,然后将钛网植入肌袋。在对侧背阔肌中采用同样方法植入加载DFDBA和CHA的钛网。在植入后13周转移个性化骨瓣修复下颌骨缺损。预制未成功的植入材料在移植后3个月取出,行组织学检查。在原位组,采用个性化钛网固定缺损,在钛网中填满复合的4种材料(表1)。

表1 实验动物分组及数量

Table 1 Experimental grouping and number of animals

预制组	背部数量	转移数量	原位组	数量
P-DFDBA-BMP	3	3	S-DFDBA-BMP	3
P-CHA-BMP	3	3	S-CHA-BMP	3
P-DFDBA	3	0	S-DFDBA	3
P-CHA	3	0	S-CHA	3

表注: DFDBA 为脱钙冻干同种异体骨; CHA 为珊瑚-羟基磷灰石; BMP 为骨形态发生蛋白。在植入背阔肌3个月, DFDBA-P组和CHA-P组未转移修复下颌骨, 植入物取出作检查。

预制个性化、血管化组织工程骨瓣: 实验动物检疫合格后, 适应环境2周。首先, 全麻下拔除双侧下颌后牙。拔牙后进行三维CT扫描, 将CT数据在图像处理软件3DMSR (3 dimension medicine surface rendering, 3DMSR, 北京吉马飞科技发展有限公司) 的工作站上, 行虚拟节段性下颌骨切除, 切除下颌骨体部2 cm; 钛网的颊侧高12 mm, 舌侧高10 mm, 金属厚度8 mm, 内径和切除的下颌骨一致。设计、制作个性化钛网进行组织工程骨的塑形和骨缺损的固定。

3个月后, 在猴的一侧背阔肌植入DFDBA-BMP-2和CHA-BMP-2, 对侧植入DFDBA和CHA。同时在对侧下颌骨行切除术, 制备节段性下颌骨缺损, 植入以上4种材料进行原位修复。氯胺酮20 mg/kg肌肉注射后, 静脉注射戊巴比妥钠15 mg/kg, 气管插管。恒河猴俯卧位, 沿背部中线切开皮肤、皮下组织, 暴露背阔肌, 在背阔肌中植入, 在肌层中间锐性分离, 制备肌袋。将材料放入钛网中, 用缝线固定后放入肌袋, 缝合固定钛网。

预制个性化骨瓣转移和材料原位植入修复下颌骨缺损: 原位植入修复下颌骨缺损的流程: 沿下颌骨下缘3横指弧形切开, 避让颊囊和面神经。切开皮肤、皮下组织直至颌下腺, 在腺体表面暴露下颌骨下缘, 小心分离骨膜, 保留口腔黏膜的完整性。用线锯节段性切除2 cm下颌骨, 止血后, 植入含或未含人重组骨形态发生蛋白2的生物材料。

植入后13周, 按照放射学和组织学检查结果, 确认预制骨成熟后, 将预制个性化骨转位, 并活检再生骨送组织学检查^[5]。程序如下: 背部沿腋窝至脊柱T₃₋₄处做切口线, 切开皮肤、皮下组织, 暴露背阔肌, 在钛网周围1 cm处分离背阔肌, 注意保护其深面的胸背动脉和胸背神经。用手指触及胸背动脉的搏动, 注意在血管蒂的周围留一定宽度

的肌肉以保护血管蒂。沿胸背动脉向近心端游离, 制备以胸背动静脉为蒂的组织工程骨瓣。分离至腋下时, 可见腋下动静脉, 在血管蒂周围带少量肌肉。常规颌下切口, 暴露下颌骨骨面, 切除下颌骨体部2 cm。制备腋下隧道, 将组织工程骨瓣转移修复下颌骨缺损, 去除植入材料两端与下颌骨残端相连处的软组织, 将钛网固定。局部放明胶海绵止血。将肌肉蒂缝合固定, 严密止血后缝合, 引流条(图1)。

不脱钙组织学检查: 所有实验动物在材料植入后的26周处死, 将其下颌骨标本用体积分数10%中性甲醛固定后行不脱钙组织学检查。下颌骨标本经梯度乙醇脱水后进树脂Technovit 7200包埋, 固化24 h后用Exakt系统(德国)进行不脱钙组织磨片的制作, 切取厚度是100 μm, 打磨至30 μm, 进行甲苯胺蓝染色。

主要观察指标: 用临床和组织学检查观察异位预制的个性化骨, 其转位后和原位植入的材料修复下颌骨的情况。

统计学分析: 用 $\bar{x}\pm s$ 进行统计, 采用SPSS 16.0软件进行统计学分析。组间比较采用one-way ANOVA, 采用Student-Newman-Kewels进行检测。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 动物大体观察结果 所有动物都能耐受手术, 修复后1-3 h苏醒, 当天可进食流质, 行动自如, 健康生存至取材时。P-DFDBA-BMP组和P-CHA-BMP组背阔肌植入材料后, 2到3周肿胀消失; P-DFDBA组和P-CHA组植入材料后, 1周肿胀消失。P-DFDBA组在植入13周时发现, 钛网从肌层部分暴露, 内为软组织充满, 未触及硬组织, 手术刀易切割。材料植入13周, P-DFDBA-BMP组和P-CHA-BMP组行组织工程骨瓣转移修复下颌骨缺损, 未出现骨瓣坏死, 伤口正常愈合。在转移后5周时发现, 口腔黏膜愈合良好, 骨折两端固定良好, 无松动; 触诊发现缺损区的两端有硬组织再生, 中间部分缺损犹存; 转位后9周, 触诊发现缺损处黏膜下有坚硬的再生骨, 未及残端, 颊侧可及部分缺损; 转位后13周取材时见, 缺损处黏膜角化完全, 黏膜下再生骨表面光滑, 再生骨和宿主骨连续性好, 高度和邻近宿主骨一致, 残端完全不可及; 组织工程骨瓣的肌蒂未萎缩, 附着于钛网的颊侧和下方。

S-DFDBA-BMP组和S-CHA-BMP组, 修复后两三周肿胀消失。S-DFDBA-BMP组在修复后4周发现, 缺损部位黏膜无红肿, 能触诊到骨缺损长度轻微缩小; 移植后13周时, 缺损区有骨再生, 颊侧骨缺损依然存在; 移植后26周时, 骨连续性未恢复, 可触及骨缺损存在。S-CHA-BMP组移植后4周缺损部位黏膜无红肿, 缺损面积明显缩小, 两端有牙槽骨再生, 残端仍可及; 移植后13周再生骨基本充满缺损区, 再生骨表面有缺损; 移植后26周, 缺损区连续性恢复, 再生骨质地坚硬, 牙槽嵴外形平滑, 外形和高度与邻近下

颌骨一致。

2.2 不脱钙组织学检查 P-DFDBA-BMP组在转位时活体显示, 钛网内有成熟的再生骨、粗大的骨小梁和骨髓形成, 新生骨包绕DFDBA; 在骨小梁的周围有圆形的成骨细胞围绕。P-CHA-BMP组的组织学观察显示CHA表面有大量的骨、骨髓组织再生, 可见破骨细胞形成的骨陷窝, 成骨细胞呈线条状沿再生骨的边缘分布。P-DFDBA组可见DFDBA大部分被吸收, 钛网内为纤维组织占据, 有少量的DFDBA残余物。P-CHA组可见钛网内为纤维组织包裹CHA块。后两组无成骨, 没有转位。

P-DFDBA-BMP组, 预制骨瓣转移3个月后, 可见下颌骨缺损完全被修复, 再生骨高度略低于周围的宿主骨, 可见残余的肌肉组织; 钛网和网内的再生骨之间未见骨结合

形成。P-CHA-BMP和S-CHA-BMP组, 取材时可见下颌骨连续性恢复, 下颌骨缺损处为粗大的骨小梁、骨髓和CHA占据, 再生骨的高度略低于两侧下颌骨的高度。预制组成骨明显强于rhBMP-2原位植入组。P-CHA-BMP组修复下颌骨的效果强于P-DFDBA-BMP组。在S-DFDBA-BMP组, 在材料植入后6个月, 下颌骨只有中部连续性没有恢复, 骨缺损处可见纤维结缔组织存在。S-DFDBA 和S-CHA组发现骨缺损大部分没有被修复(图2)。

各组下颌骨缺损的修复率见图3。

3 讨论 Discussion

在组织工程领域, 骨组织工程是目前最接近于临床的^[21]。本实验利用最接近人类的灵长类动物, 成功构建组织

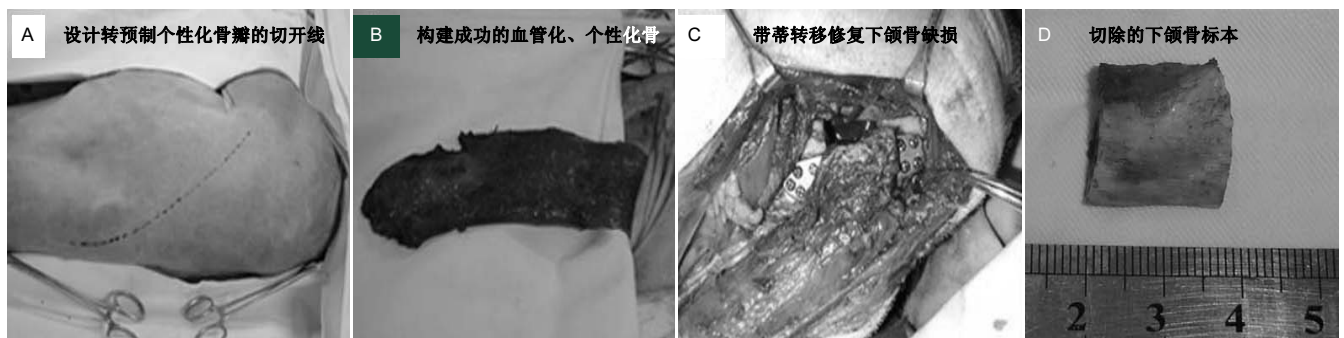


图1 预制个性化骨瓣转移修复下颌骨节段性缺损

Figure 1 Mandibular segmental defect reconstructed with prefabricated customized bone flap

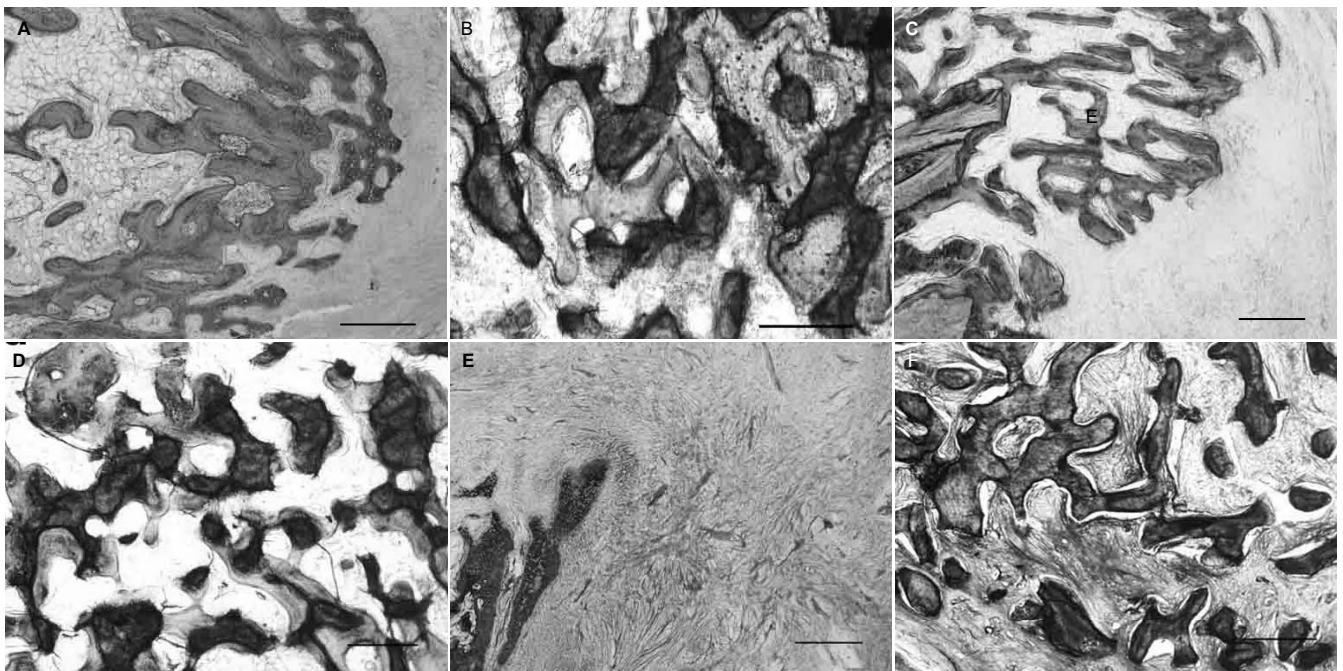


图2 采用预制个性化骨瓣修复下颌骨缺损组织学检查和形态学分析(甲苯胺蓝染色, 标尺: 500 μm)

Figure 2 Histology and histomorphometry examination of the reconstructed mandible with prefabricated customized bone flaps (toluidine blue staining, scale bar: 500 μm)

图注: ①DFDBA: 脱钙冻干同种异体骨; CHA: 珊瑚-羟基磷灰石; BMP: 骨形态发生蛋白; P: 预制; S: 原位。②图中A为P-DFDBA-BMP组: 可见再生骨成熟, 修复下颌骨缺损; B和D为P-CHA-BMP和S-CHA-BMP组: CHA和再生骨融合, 骨形态成熟, 充满下颌骨缺损处; C为S-DFDBA-BMP组: 虽然大部分的缺损修复, 中间下颌骨缺损处仍为纤维组织占据, 下颌骨连续性未恢复; E为S-DFDBA组: 见大部分的下颌骨缺损处为纤维组织, 下颌骨连续性未恢复; F为S-CHA组: 可见大量纤维组织和块状CHA残留, 下颌骨连续性未恢复。

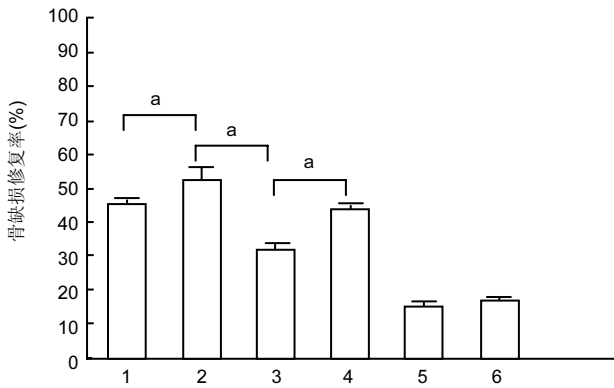


图3 彩用预制骨和骨形态发生蛋白2原位植入修复下颌骨缺损情况
Figure 3 Mandibular defects repaired with prefabricated bone and recombinant human bone morphogenetic protein-2 applied *in situ*
图注: 1: 预制脱钙冻干同种异体骨-骨形态发生蛋白组; 2: 预制珊瑚-羟基磷灰石-骨形态发生蛋白组; 3: 原位脱钙冻干同种异体骨-骨形态发生蛋白组; 4: 原位珊瑚-羟基磷灰石-骨形态发生蛋白组; 5: 原位脱钙冻干同种异体骨组; 6: 原位珊瑚-羟基磷灰石组。^a $P < 0.05$, 可见预制组修复下颌骨缺损优于原位组。

工程骨瓣修复下颌骨缺损的动物模型, 为该项目的临床应用打下基础。由于恒河猴价格昂贵, 实验分组较多, 虽然存在样本小的问题, 仍然能对进一步的临床应用提供参考。

目前颌骨组织工程主要采用两种方法进行诱导成骨, 一种基于细胞的方法, 采用成骨细胞、间充质干细胞等和支架复合后植入骨缺损处进行修复^[22]。在肌肉等血流丰富的部位, 将复合细胞的支架血管化后转移修复颌骨缺损; 在临床应用时, 干细胞涉及伦理学、致癌性、免疫排斥、恶性分化等诸多问题。另一种主要采用具有成骨作用的细胞因子进行骨的再生^[23-24]。采用生物工程生产的人重组骨形态发生蛋白2具有质量稳定、产量高以及对人体使用相对安全等优点, 目前已经被美国食品药品监督管理局(FDA)批准在临床使用^[25]。自体的组织和细胞在移植时不会产生细胞体外培养可能产生的污染和排斥; 而且, 体内构建的组织工程骨能快速血管化, 而体外构建的骨组织很难建立有效的营养供应系统, 无法构建大块骨组织。此外, 人重组骨形态发生蛋白2已经被FDA批准在骨不连、牙槽骨再生、上颌窦提升时应用, 其生物安全性已得到证实^[26]。应用人重组骨形态发生蛋白2进行颌骨组织工程的恒河猴动物实验研究, 在成功后便于向临床推广。

促进组织工程骨血管化, 目前在4个方面进行研究。①材料方面, 对材料的表面进行修饰、如在表面添加促进内皮细胞黏附和繁殖的物质, 如胶原等; 选择合适的孔径和孔隙率使血管容易长入; 体外构建血管网。目前证实材料内径在200-500 μm 是促进成骨的合适孔径, 孔隙率一般在70%以上。②加入能促进成骨和血管长入的细胞因子, 如促进成骨的细胞因子如人重组骨形态发生蛋白2、促进血管化的血管内皮生长因子以及包含各种细胞因子的提取物, 如富血小板血浆等。③在材料上加入血管内皮细胞, 和成骨细胞共培养, 促进其血管化。④采用外科手段, 如植入

血管丰富的肌肉、放置在知名血管周围或血管束穿过支架、筋膜包裹等^[27]。本实验将大肠杆菌生产的人重组骨形态发生蛋白2复合在脱钙冻干同种异体骨和珊瑚-羟基磷灰石两种支架上, 植入到血流丰富的背阔肌中, 结合外科手术和材料表面复合细胞因子两种方法, 达到了促进组织工程骨血管化的目的。

口腔颌面部恶性肿瘤侵犯下颌骨需要进行节段性下颌骨切除术, 这类缺损是临床上最常见的、最难修复的下颌骨缺损之一^[28]。Terheyden等采用成骨蛋白1在小型猪体内成功构建组织工程骨瓣, 游离后转移修复下颌骨角部矩形缺损^[13-14, 16]。下颌骨角部缺损目前在临床上较少见, 不能模拟临床最常见的节段性缺损。本实验依据国内外的研究文献, 制备2 cm长的节段性下颌骨缺损是恒河猴自行不能愈合的临界性下颌骨骨缺损^[17, 20]。

在实验中, 个性化钛网既有塑形载体和再生骨的功能, 又起到内固定的作用; 在完成修复后, 也不需要取出。在临床上, 个性化钛网作为下颌骨缺损的内固定材料已有较多报道^[10]。本实验用的个性化钛网和手术导板是根据猴下颌骨的CT数据, 采用快速成形技术设计制作的, 其大小和形状和数据来源的下颌骨完全吻合; 植入背部时将载体材料在钛网内充填, 能保证成骨形状和大小满足个性化修复的需要。在实验中, 钛网的高度统一设计为12 mm, 将材料填入钛网后, 缺损处钛网的上方空间并没有用材料填充, 减少骨传导对实验结果的影响。本实验采用带蒂转移, 无一例出现术后的瓣坏死。Warnke等^[10]也采用背阔肌进行组织工程骨瓣的预构取得成功, 但是转移时他采用血管吻合的方法进行修复, 其手术创伤大、时间长、难度大, 对术者的要求较高; 实验采用带蒂转移的方法进行转移, 创伤小、手术时间相对短、难度小, 易于在临床推广应用。带蒂转移的主要缺点是受供转移半径的限制, 这种方法对于修复下颌骨、口底的缺损效果较好。通过解剖, 发现恒河猴背阔肌由胸背动静脉进行营养的供应, 肌层具有一定的厚度和宽度, 可以带蒂转移到下颌区; 猴的背阔肌和人相比有完整的、较单一的供血系统, 但血管的直径很细, 血管吻合时对显微外科技术的要求较高。此外, 由于恒河猴头颈部固定困难, 采用血管吻合的方法将背阔肌构建的组织工程骨瓣转移术后的护理困难, 并发症的发生可能危及组织工程骨瓣的存活, 因此实验选择带蒂转移。在腋下制备隧道, 进行带蒂转移, 可以减少游离后显微血管吻合所带来的风险。植入背阔肌时, 将钛网植入背阔肌较低的位置, 可以保证胸背动静脉的血管蒂有较长的旋转半径, 骨瓣转移时不存在较大的张力, 减少对血管蒂的损伤。背阔肌瓣可以带肌肉或皮肤等软组织, 有利于修复包括软组织、骨组织的复合性缺损。

致谢: 感谢301医院耳鼻喉研究所和口腔医学实验室; 山西奥瑞生物材料、易华健珊瑚和北京吉马飞科技有限公司的大力支持。

作者贡献: 胡敏、俞光岩进行实验设计, 周苗、彭歆、车月娟、毛驰进行实施, 周苗进行实验评估及资料收集, 周苗、俞光岩成文、审校并对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 预制个性化骨瓣—是一种结合现代快速成形技术和组织工程理念, 在体内预构的、血管化的、和局部骨缺损形状相吻合的新生的、个性化骨组织, 以修复全身骨缺损的一种方法。

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] Lim YS, Kim JS, Kim NG, et al. Free Flap Reconstruction of Head and Neck Defects after Oncologic Ablation: One Surgeon's Outcomes in 42 Cases. *Arch Plast Surg*. 2014; 41(2):148-152.
- [2] Li W, Xu Z, Liu F, et al. Vascularized free forearm flap versus free anterolateral thigh perforator flaps for reconstruction in patients with head and neck cancer: assessment of quality of life. *Head Neck*. 2013;35(12):1808-1813.
- [3] Cai M, Lu X, Yang D, et al. Application of a Novel Intraorally Customized Transport Distraction Device in the Reconstruction of Segmental Mandibular Defect. *J Craniofac Surg*. 2014 Apr 2.
- [4] Cai M, Lu X, Shen G, et al. Customized bifocal and trifocal transport distraction osteogenesis device for extensive mandibular reconstruction. *J Craniofac Surg*. 2011;22(2): 562-565.
- [5] Ko EC, Chang CM, Chang P, et al. Tibial Cancellous Bone Grafting in Jaw Reconstruction: 10 Years of Experience in Taiwan. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013.
- [6] Chao JW, Rohde CH, Chang MM, et al. Oral rehabilitation outcomes after free fibula reconstruction of the mandible without condylar restoration. *J Craniofac Surg*. 2014;25(2): 415-417.
- [7] Zhu J, Xiao Y, Liu F, et al. Measures of health-related quality of life and socio-cultural aspects in young patients who after mandible primary reconstruction with free fibula flap. *World J Surg Oncol*. 2013;11:250.
- [8] Ozmen S, Uygur S, Eryilmaz T, et al. Osseous regeneration of the free fibula flap resembling a firm mass after mandible reconstruction. *J Craniofac Surg*. 2012;23(3):949.
- [9] Serra T, Ortiz-Hernandez M, Engel E, et al. Relevance of PEG in PLA-based blends for tissue engineering 3D-printed scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;38:55-62.
- [10] Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet*. 2004;364(9436):766-770.
- [11] Heliotis M, Lavery KM, Ripamonti U, et al. Transformation of a prefabricated hydroxyapatite/osteogenic protein-1 implant into a vascularised pedicled bone flap in the human chest. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006;35(3):265-269.
- [12] Warnke PH, Wiltfang J, Springer I, et al. Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials*. 2006;27(17): 3163-3167.
- [13] Terheyden H, Jepsen S, Rueger DR. Mandibular reconstruction in miniature pigs with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: a preliminary study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1999;28(6):461-463.
- [14] Terheyden H, Knak C, Jepsen S, et al. Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001;30(5):373-379.
- [15] Warnke PH, Springer IN, Acil Y, et al. The mechanical integrity of in vivo engineered heterotopic bone. *Biomaterials*. 2006; 27(7):1081-1087.
- [16] Terheyden H, Menzel C, Wang H, et al. Prefabrication of vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1—part 3: dosage of rhOP-1, the use of external and internal scaffolds. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004;33(2):164-172.
- [17] Zhou M, Peng X, Mao C, et al. Primate mandibular reconstruction with prefabricated, vascularized tissue-engineered bone flaps and recombinant human bone morphogenetic protein-2 implanted in situ. *Biomaterials*. 2010;31(18):4935-4943.
- [18] Boyne PJ, Salina S, Nakamura A, et al. Bone regeneration using rhBMP-2 induction in hemimandibulectomy type defects of elderly sub-human primates. *Cell Tissue Bank*. 2006;7(1): 1-10.
- [19] Takahashi Y, Yamamoto M, Yamada K, et al. Skull bone regeneration in nonhuman primates by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. *Tissue Eng*. 2007;13(2):293-300.
- [20] Seto I, Asahina I, Oda M, et al. Reconstruction of the primate mandible with a combination graft of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and bone marrow. *J Oral Maxillofac Surg*. 2001;59(1):53-61.
- [21] Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):363-408.
- [22] Zhan K, Bai L, Xu J. Role of vascular endothelial progenitor cells in construction of new vascular loop. *Microvasc Res*. 2013;90:1-11.
- [23] Liu X, Zhao K, Gong T, et al. Delivery of growth factors using a smart porous nanocomposite scaffold to repair a mandibular bone defect. *Biomacromolecules*. 2014;15(3):1019-1030.
- [24] Romagnoli C, D'Asta F, Brandi ML. Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2013;10(3):155-161.
- [25] Tannoury CA, An HS. Complications with the use of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in spine surgery. *Spine J*. 2014;14(3):552-559.
- [26] Herford AS, Boyne PJ, Williams RP. Clinical applications of rhBMP-2 in maxillofacial surgery. *J Calif Dent Assoc*. 2007; 35(5):335-341.
- [27] Santos MI, Reis RL. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci*. 2010;10(1):12-27.
- [28] Fernandes RP, Yetzer JG. Reconstruction of acquired oromandibular defects. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2013;25(2):241-249.