

# 冻干处理犬同种异体下颌骨：满足重建的强度、外形及支持能力

景彩霞<sup>1</sup>, 刘昌奎<sup>2</sup>, 谭新颖<sup>2</sup>, 胡敏<sup>2</sup>(<sup>1</sup>延安大学医学院病原生物学教研室, 陕西省延安市 716000; <sup>2</sup>解放军总医院口腔科, 北京市 100853)

## 文章亮点:

- 1 由于下颌骨中颞下颌关节具有特殊的结构和功能, 要重建颞下颌关节的精细结构并恢复其功能, 目前的组织工程支架在形态和强度上还很难达到这一要求。
- 2 同种异体骨与自体骨有相似的解剖外形和生物学特性, 且冻干处理同种异体骨制作技术成熟、安全, 不需要免疫抑制剂, 材料来源丰富, 不需降解。但同种异体骨移植存在的最主要问题是免疫排斥和成骨速度缓慢。
- 3 实验对犬同种异体骨进行冻干处理, 并在其表面制造一定孔隙, 以提高其成骨速度, 尽管强度有所下降, 但仍能达到重建下颌骨及颞下颌关节的要求, 组织病理检查及扫描电镜观察证实冻干处理后的同种异体骨活细胞全部被消除, 有效降低了其免疫原性。

## 关键词:

生物材料; 骨生物材料; 同种异体骨; 下颌骨; 冻干处理; 国家自然科学基金

## 主题词:

下颌骨; 生物力学; 冷冻干燥法

## 基金资助:

国家自然科学基金(81470726)

## 摘要

**背景:** 同种异体颞下颌关节具有良好的外形结构、生物学特性, 成为解决髁突缺损的有效方法之一, 但是免疫排斥和成骨速度缓慢是同种异体骨移植存在的主要问题。

**目的:** 对犬下颌骨进行冻干处理, 使其满足同种异体骨支架重建下颌骨缺损的需要。

**方法:** 获取 12 只比格犬下颌骨, 去除骨膜、软组织、软骨等, 用裂钻将颊侧皮质骨制造出直径为 1 mm 的孔隙, 孔隙间距为 1.0-2.0 cm。清洗干净后, 先放入 -4 °C 的冷库中, 12 h 后逐渐降至 -80 °C 保存, 1 周后将冷冻骨放入干燥机内, 使骨组织内剩余水分降低到 5% 以下, 然后进行无菌包装, 辐射灭菌后, 置于无菌真空器中常温保存。冻干处理后进行生物力学检测。

**结果与结论:** 压缩实验和弯曲实验的载荷-位移曲线均显示冻干骨的最大位移较小, 曲线陡直, 塑性区不明显, 压力一旦超过弹性区迅速出现骨断裂。冻干骨压缩实验的最大载荷为(5 163.10±730.16) N, 最大位移为(0.78±0.19) mm, 刚度为(11 069.17±1 758.12) N/mm; 弯曲实验的最大载荷为(486.67±134.12) N, 最大位移为(0.67±0.15) mm, 刚度为(1 151.67±256.46) N/mm。表明经水化处理后的冻干干燥犬下颌骨强度可以保持良好的外形及较好的支持能力, 能够满足下颌骨修复重建的力学要求。

景彩霞, 刘昌奎, 谭新颖, 胡敏. 冻干处理犬同种异体下颌骨: 满足重建的强度、外形及支持能力[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(25):3977-3982.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.25.009

## Lyophilizing canine allogeneic mandible: meeting the requirements for rebuilding strength, shape and support capabilities

Jing Cai-xia<sup>1</sup>, Liu Chang-kui<sup>2</sup>, Tan Xin-ying<sup>2</sup>, Hu Min<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of Pathogenic Biology, Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China; <sup>2</sup>Department of Stomatology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** The favorable structure and biological characteristics of allogeneic temporomandibular joint become an effective solution for condylar defect, but immunologic rejection and slow ossification are the main problem for the presence of bone allograft.

**OBJECTIVE:** To meet the requirements of rebuilding mandible defect by lyophilizing canine mandible.

**METHODS:** The periosteum, soft tissue, and cartilage of 12 canine mandibles were removed. 1 mm diameter hole was drilled with 1 to 2 cm intervals in their cortical bones with a fissure bur. After washing, they were placed into a -4 °C refrigerator for 12 hours, and then stored at -80 °C gradually for 1 week. The mandibles were put in a drier. When the moisture content of osseous tissue decreased to 5%, the bones were packed in aseptic environment, radio pasteurized, and stored in vacuum container at atmosphere temperature. A biomechanical test was conducted after the lyophilization.

景彩霞, 女, 1974 年生, 陕西省延安市人, 汉族, 2009 年四川大学毕业, 硕士, 讲师, 主要从事分子病原生物学研究。

通讯作者: 胡敏, 教授, 博士生导师, 解放军总医院口腔科, 北京市 100853

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2015)25-03977-06

稿件接受: 2015-03-19

http://www.crter.org

Jing Cai-xia, Master, Lecturer, Department of Pathogenic Biology, Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China

Corresponding author: Hu Min, Professor, Doctoral supervisor, Department of Stomatology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Accepted: 2015-03-19

**RESULTS AND CONCLUSION:** The maximum shifts of lyophilized mandibles in compression and bending tests were slight according to the steep load-shift curve. The plastic zone was insignificant and fractures appeared immediately when the pressure exceeded the plastic zone. The maximum load, maximum shift, and rigidity in the compression test were (5 163.10±730.16) N, (0.78±0.19) mm and (11 069.17±1 758.12) N/mm, respectively. The data in bending test were (486.67±134.12) N, (0.67±0.15) mm and (1 151.67±256.46) N/mm, respectively. It is concluded that the dehydrated and lyophilized canine mandibles have good shape and support ability and can meet the mechanical requirements in repairing and reconstructing mandibular defect.

**Subject headings:** Mandible; Biomechanics; Freeze Drying

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81470726

Jing CX, Liu CK, Tan XY, Hu M. Lyophilizing canine allogeneic mandible: meeting the requirements for rebuilding strength, shape and support capabilities. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(25):3977-3982.

## 0 引言 Introduction

肿瘤、外伤、感染等疾病所导致的下颌骨缺损严重影响患者的生活质量和心理健康,因此,下颌骨缺损修复重建是口腔医学的重要研究领域。目前,临床常用的修复方法包括自体骨移植、同种异体骨移植及牵张成骨等,这些方法存在着许多不足,如自体骨供骨量有限,二次手术创伤,供区畸形<sup>[1]</sup>;同种异体骨来源不足、成骨慢,存在免疫排斥反应<sup>[2]</sup>;牵张成骨疗程长,患者依从性差等,限制了其在颌骨缺损修复的应用。

近年来,骨组织工程在下颌骨缺损修复中取得了不断进展<sup>[3]</sup>。组织工程骨具有供体来源不受限、创伤小、无抗原性、可个性化修复的优势,是下颌骨缺损的理想修复方法。骨组织工程的核心要素包括支架、种子细胞及促骨形成的生长因子。对于支架材料的要求包括以下几方面<sup>[4-5]</sup>:良好的生物相容性;三维多孔结构,孔隙相互连通;可降解吸收,降解产物对机体无毒副作用,降解速率和新骨形成的速率相匹配;生物力学强度与下颌骨相匹配度,能够行使正常的咀嚼功能;易于塑形。随着计算机技术和快速成型技术的不断发展,骨组织工程支架可以按照缺损部位进行塑形和加工,满足了下颌骨缺损个性化修复的需求。根据材料属性,应用于颌骨组织工程支架可分为以下几类。①生物衍生骨:如自体骨<sup>[6]</sup>、同种异体骨及珊瑚<sup>[7-10]</sup>,来源于天然生物组织,具有良好的生物相容性和力学性能,能够被机体降解吸收,而且经过处理后几乎无免疫原性。珊瑚羟基磷灰石来源于珊瑚,具有天然三维多孔结构。Zhou等<sup>[10]</sup>通过比较CAD制作个性化钛网加载脱矿冷冻干燥骨或珊瑚羟基磷灰石复合人重组骨形态发生蛋白2预制血管化的组织工程骨修复恒河猴下颌骨缺损效果时,发现珊瑚羟基磷灰石具有较好的骨诱导性,是理想的组织工程骨支架材料。②生物陶瓷:具有良好的生物相容性和骨传导性,其主要组成元素为钙、磷,是骨组织中的主要无机成分。生物陶瓷包括生物活性陶瓷,如羟基磷灰石;生物降解陶瓷如磷酸三钙。Ciocca等<sup>[11]</sup>采用多孔羟基磷灰石支架复合自体骨髓基质干细胞和血小板凝胶修复羊颞下颌关节髁突,4个月后有明显的新骨形成。Yuan等<sup>[12]</sup>用β-磷酸三钙复合自体骨髓间充质干细胞修复犬下颌骨3 cm缺损,术后

4周有大量新骨形成,32周达到骨愈合,认为β-磷酸三钙是一种良好的骨组织工程支架材料。虽然生物陶瓷硬度高,但是脆性大,仅用于非承重区骨缺损修复,对于大段骨缺损修复,需要复合其他材料应用。③生物高分子材料:包括天然高分子和合成高分子材料。天然高分子材料如胶原、甲壳素及其衍生物、海藻酸盐等,具有良好的生物相容性、生物活性和可降解性,但存在力学强度差、降解速率快等不足,常作为生长因子载体,可注射水凝胶或与其他材料制备复合支架。Fan等<sup>[13]</sup>用壳聚糖和硫酸软骨素制备三维多孔支架,经磷灰石涂层改性后加载骨形态发生蛋白2、脂肪干细胞有效修复了鼠下颌骨缺损。合成高分子材料包括聚乳酸、聚乙醇酸、聚己酸内酯等,性能稳定,可塑性强,降解速率可调控,但也存在降解产物为酸性、力学强度不足等缺点。Ren等<sup>[14]</sup>将聚乳酸-聚乙二醇和聚乙醇酸两种材料分别加载骨髓间充质干细胞修复兔下颌骨缺损,12周后缺损区有大量的新骨形成,认为聚乙醇酸具有更好的成骨能力。而Chancharonsook等<sup>[15]</sup>将选择性激光烧结制作的多孔聚己酸内酯支架用磷酸磷灰石涂层后,复合人重组骨形态发生蛋白2或自体骨髓细胞修复猴下颌骨节段性缺损,发现术后感染率较高,聚己酸内酯支架的承重能力不足。④复合型支架:单一的生物材料无法满足颌骨缺损修复的需要,多种材料组合形成的复合型支架更符合颌骨组织工程的要求。Matusuo等<sup>[16]</sup>采用羟基磷灰石/聚乳酸支架复合自体骨髓和富血小板血浆修复犬下颌骨缺损,1年后形成了足够的骨量,精确地修复了缺损。Zhao等<sup>[17]</sup>用磷灰石涂层的丝素纤维支架复合自体骨髓间充质干细胞修复犬下颌骨下缘临界缺损时发现,术后12个月缺损区达到完全骨愈合,与自体骨修复无差别,认为该支架具有良好的骨传导性,极大促进了骨再生。⑤金属:钛及钛合金是骨内固定最常用的金属材料,具有良好的生物相容性和耐腐蚀性,虽然不能降解吸收,但可在体内长期存留且力学强度高。因此,常被作为组织工程支架辅助材料,增强组织工程骨的强度。Xi等<sup>[18-20]</sup>通过钛网来加强多孔珊瑚复合骨髓细胞构建的组织工程骨,成功恢复了犬下颌骨缺损。

由于下颌骨中颞下颌关节具有特殊的结构和功能,要重建颞下颌关节的精细结构并恢复其功能,目前的组织工

程支架在形态和强度上还很难达到这一要求。同种异体骨与自体骨有相似的解剖外形和生物学特性, 且冻干处理同种异体骨制作技术成熟、安全, 不需要免疫抑制剂, 材料来源丰富, 不需降解。同时经冻干的同种异体骨仍含有骨形态发生蛋白和胶原, 能提供良好的细胞外基质和生长因子, 促进骨细胞的分化。本实验对犬同种异体骨进行冻干处理及检测, 期望能满足骨组织工程支架材料的要求。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 观察实验。

**时间及地点:** 于2013年1月至2014年8月在解放军总医院口腔研究所完成。

**材料:**

**实验动物:** 12月龄雌性比格犬16只, 购于解放军总医院动物实验中心。

冻干处理犬同种异体下颌骨实验的主要仪器:

仪器	来源
超声波清洗器	中国北京
电锯	中国江苏
FD-1 型冷冻干燥机	北京博医康公司
扫描电子显微镜	S-3400N 日本
858M iniB ion ix II 生物力学实验机	美国 MTS 公司
-80 °C 的冰箱	Thermo 公司, 美国
<sup>60</sup> Co 照射	解放军军事医学科学院

**实验方法:**

**同种异体骨的处理:** 无菌条件下切取比格犬带髁突的半侧下颌骨, 剥离附着的肌肉、血管、结缔组织及髁突表面软组织, 采用电锯从右侧下颌髁孔处锯断, 测量骨段大小, 用直径为1 mm骨钻透颊舌侧及髁突表面皮质骨, 孔与孔之间间距为3-5 mm(图1A)。用1:1氯仿/甲醇溶液脱脂处理4 h, 生理盐水反复加压冲洗去除残留血液和骨髓; 先将移植骨放入-4 °C的冷库中, 12 h后逐渐降至-80 °C保存, 1周后将冷冻骨放入干燥机内, 使骨组织内剩余水分降低到5%以下, 然后进行无菌包装, 辐射灭菌后, 置于无菌真空中常温保存(图1B)。

**同种异体冻干骨的检测:**

**组织学检测:** 将新鲜的下颌骨和同种异体骨浸入体积分数10%中性甲醛固定24 h, EDTA脱钙至骨组织变软, 流

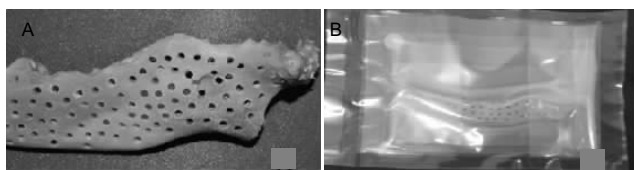


图1 同种异体骨的处理

Figure 1 Allogeneic bone processing

图注: 图中A为将同种异体骨制成一定孔隙; B为冻干处理后真空密封包装。

水冲洗过夜。脱水机脱水, 常规石蜡包埋, 3-5 μm切片, 苏木精-伊红染色, 光镜下观察同种异体骨的组织学结构。

**苏木精-伊红染色:** ①烤片: 将骨组织石蜡切片置于60 °C恒温箱中烘烤过夜。②脱蜡: 将骨组织的石蜡切片依次浸于二甲苯I、II中各20 min脱蜡, 然后浸入无水乙醇中10 min, 体积分数95%, 85%, 75%乙醇中各5 min梯度乙醇水化。③骨组织切片依次放入自来水中2 min, 苏木精染色10 min。④自来水冲洗1 min, 0.5%盐酸-乙醇快速分化数秒, 流水冲洗1 min。⑤切片置于返蓝液中1 min, 流水冲洗。⑥伊红染色30 s。⑦体积分数80%, 95%, 100%乙醇梯度脱水, 使用二甲苯I、II、III透明, 然后在室温下中性树脂封固, 显微镜下观察。

**Masson三色染色:** ①骨组织石蜡切片脱蜡至水(同苏木精-伊红染色)。②自来水、蒸馏水漂洗后用Regaud苏木精染液5-10 min。③自来水冲洗5 min后, 蒸馏水洗1遍。④ Masson 丽春红酸性复红液5-10 min。⑤2%冰醋酸水溶液浸洗。⑥1%磷钼酸水溶液分化3-5 min。⑦苯胺蓝液染5 min。⑧0.2%冰醋酸水溶液浸洗。⑨体积分数75%, 85%, 95%乙醇、无水乙醇、二甲苯透明、中性树脂封固。

**扫描电镜观察:** 将新鲜下颌骨髁突片和同种异体冻干下颌骨髁突片在2.5%戊二醛固定2 h, 体积分数30%, 50%, 70%, 90%, 100%乙醇梯度脱水(5 min 1次), 0.2%磷酸盐缓冲液冲洗3次, 每次10 min, 醋酸异戊酯置换(15 min 1次), 空气干燥。扫描电镜观察处理后的冻干骨与未处理新鲜下颌骨髁突的微观形态及骨小梁情况。

**生物力学检测:** ①抗弯曲生物力学测试: 由于下颌骨髁突形态不规则, 生物力学检测时不易固定, 因此选取部分冻干下颌骨进行生物力学检测。在冻干处理后的下颌骨第二磨牙下方截取高12.0 mm、长8.0 mm的骨段做为抗压缩实验的试件, 从下颌骨第一磨牙远中下方向前截取高5.0 mm、长30.0 mm的骨段做为抗弯曲实验的试件, 进行生物力学检测(图2)。冻干骨在测试前6 h放入4 °C生理盐水中进行水化。然后将其置于实验机的工作台上, 以跨距25 mm、100 N预压3次, 消除骨组织黏弹性对测试结果的影响。测试加载速度为0.5 mm/min, 测量精度为0.05%。载荷-位移曲线由计算机自动绘制, 其在冻干骨出现断裂变形时结束。②抗压缩生物力学测试: 方法与抗弯曲生物力学测试相同, 仅将预压力调整为200 N。

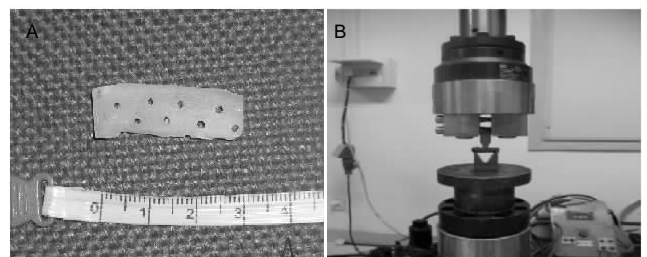


图2 冻干同种异体骨试件的生物力学检测

Figure 2 Biomechanical test of lyophilized allogeneic bone sample

图注: 图中A为抗弯曲实验的试件, B为生物力学弯曲实验检测。

**主要观察指标:** 同种异体冻干骨的组织学与生物力学检测。

**统计学分析:** 采用SPSS 13.0软件对新鲜骨组、冻干骨的弯曲实验及压缩实验进行最大载荷、最大位移和刚度的配对 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异有显著性意义。利用 GraphPad prism 6.0 软件对弯曲实验的最大载荷、最大位移及刚度数据绘图。

## 2 结果 Results

### 2.1 同种异体冻干骨的组织学观察

**苏木精-伊红染色:** 新鲜骨由致密的骨皮质和内侧的骨松质构成, 骨皮质内部为骨松质, 是由疏松多孔的组织构成, 骨松质内含有大量的细胞; 同种异体冻干骨的致密骨和松质骨结构清晰, 骨陷窝及松质骨周围没有细胞残余(图 3)。

**Masson 染色:** 新鲜骨与冻干骨的 Masson 染色可见骨纤维素被染成红色, 胶原纤维呈蓝色, 胞浆、肌肉、纤维素、神经胶质呈红色, 胞核黑蓝色(图 4)。同种异体冻干骨与新鲜骨骨纤维及胶原纤维未见明显区别, 说明冻干处理后对骨组织结构没有明显破坏。

**2.2 同种异体冻干下颌骨髁突的扫描电镜观察** 扫描电镜观察新鲜下颌骨髁突和同种异体冻干下颌骨髁突, 可见新鲜骨骨小梁被大量的细胞包裹, 而经处理后的同种异体冻干骨其上未见细胞附着(图 5)。

**2.3 同种异体冻干骨的生物力学测试** 新鲜下颌骨抗弯曲实验的最大载荷和最大位移显著高于冻干下颌骨 ( $P < 0.01$ ), 刚度显著低于冻干下颌骨 ( $P < 0.05$ ), 见表 1; 弯曲实验的断裂部位在加压处, 断裂的试样呈裂纹状。

表 1 新鲜下颌骨与冻干骨抗弯曲实验及的压缩实验比较 (x±s)  
Table 1 Compression and bending tests of fresh versus lyophilized mandibles

组别	抗弯曲实验		
	最大载荷(N)	最大位移(mm)	刚度(N/mm)
新鲜下颌骨	688.97±92.07	1.05±0.11	791.83±177.79
冻干下颌骨	486.67±134.12	0.67±0.15	1 151.67±256.46
<i>P</i>	< 0.05	< 0.05	< 0.05

组别	压缩实验		
	最大载荷(N)	最大位移(mm)	刚度(N/mm)
新鲜下颌骨	5 079.5±1 014.98	1.01±0.16	9 837.83±1 580.63
冻干下颌骨	5 163.10±730.16	0.78±0.19	11 069.17±1 758.12
<i>P</i>	> 0.05	< 0.05	> 0.05

新鲜下颌骨与冻干下颌骨压缩实验的最大载荷、刚度相比差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 而新鲜下颌骨的最大位移显著高于冻干组 ( $P < 0.05$ ), 见表 1; 压缩实验的断裂部位在舌侧骨皮质相对薄弱处。

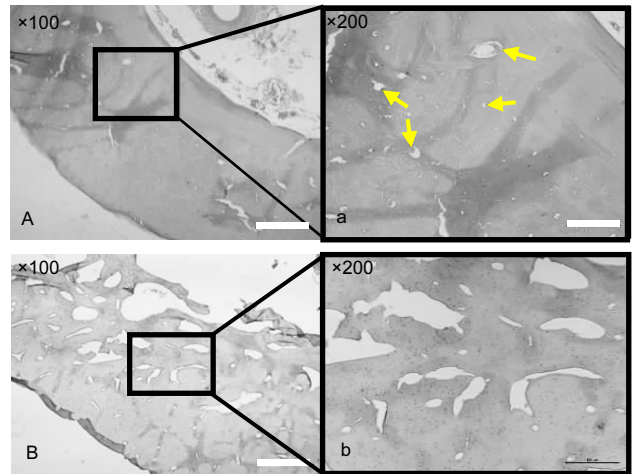


图 3 新鲜下颌骨及冻干下颌骨的苏木精-伊红染色(标尺为 100 μm)  
Figure 3 Hematoxylin-eosin staining of fresh and lyophilized mandibles (scale bar=100 μm)

图注: 图中 A 为新鲜下颌骨横断面, 骨小梁内可见细胞, 见箭头示; B 为冻干下颌骨横断面, 骨小梁内未见细胞残余。

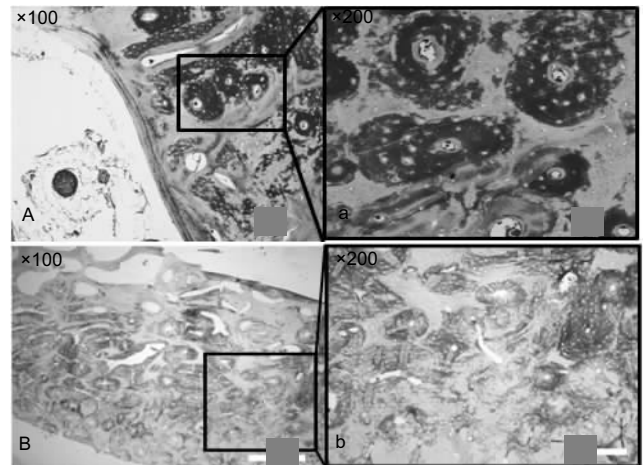


图 4 新鲜下颌骨及冻干下颌骨的 Masson 三色染色(标尺为 100 μm)  
Figure 4 Masson trichrome staining of fresh and lyophilized mandibles (scale bar=100 μm)

图注: 图中 A 为新鲜下颌骨横断面, 骨小梁内可见大量细胞; B 为冻干下颌骨横断面, 骨小梁内未见细胞残余。

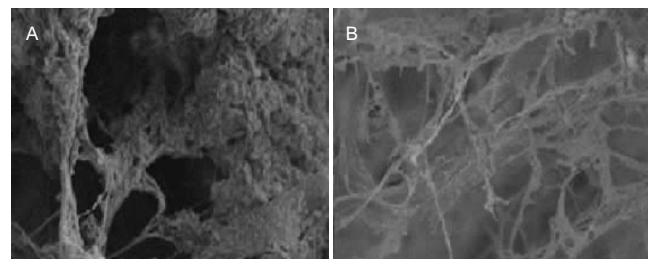


图 5 下颌骨冻干处理前后的扫描电镜观察(×200)

Figure 5 Scanning electron microscopy before and after lyophilization (×200)

图注: 图中 A 为新鲜下颌骨扫描电镜可见骨小梁有细胞及基质包裹; B 为冻干骨扫描电镜未见细胞附着。

## 3 讨论 Discussion

随着骨库的大量建立, 同种异体骨处理及储存方法的

改进, 同种异体颞下颌关节因其良好的外形结构、生物学特性, 成为解决髁突缺损的有效方法之一。但同种异体骨移植存在的最主要问题是免疫排斥和成骨速度缓慢。为了加速成骨, 有学者采用血管化的同种异体骨移植, 术后多数需要长期甚至终身使用免疫抑制剂<sup>[21]</sup>, 免疫抑制剂有强的细胞毒性作用, 有时会带来威胁生命的不良反应, 因此这种方法是不可取的。为了降低同种异体骨的免疫原性, 许多学者开始对同种异体骨的处理方法进行改进<sup>[22-23]</sup>, 最成功的是冻干和深冷冻处理, 特别是冻干处理后能有效降低免疫原性, 这是由于异体骨的免疫原性主要来自骨组织中的细胞成分, 冻干处理后活细胞全部被消除, 本实验的组织病理检查及扫描电镜观察证实了这一点, 因此有效降低了其免疫原性。冻干处理后的同种异体骨尽管强度有所下降, 但仍能达到重建下颌骨及颞下颌关节的要求<sup>[24-25]</sup>。但冻干后的同种异体骨又出现另一严重问题, 即更加降低了成骨速度。有研究发现大段同种异体骨5年后仅20%被新骨替代<sup>[25]</sup>。由于冻干同种异体骨长时间以死骨形式存在体内, 难免会引起感染、吸收、骨折等一系列并发症。为了加速成骨, 首先应明确同种异体骨移植愈合机制, 国内外学者对此进行大量研究, 发现有以下愈合方式: ①自生成骨作用: 新鲜的同种异体骨移植, 存活的细胞具有早期成骨能力, 但因免疫反应, 供体来源的细胞被杀死, 早期成骨亦被吸收, 所以这种成骨作用是无效的。冷冻和冻干骨细胞成分多已死亡, 不具备自身成骨能力。②骨传导作用: 骨传导作用也就是支架作用, 是移植骨周围组织床的血管、骨祖细胞沿植入物的机械引导侵入其内部, 实现爬行替代的过程。同种异体骨移植的愈合、替代过程主要依靠骨的传导作用。③骨诱导作用: 骨诱导作用是指来自植床周边宿主结缔组织中的可诱导成骨前体细胞即间充质细胞, 在诱导因子的作用下被诱导成骨原细胞, 经成骨细胞形成新骨, 这种成骨方式是间接的, 称为骨诱导。骨诱导在同种异体骨移植愈合早期发挥重要作用。

黄长明等<sup>[26]</sup>研究发现, 同种异体骨移植后的愈合过程不仅有自体宿主骨向移植骨爬行替代过程, 移植骨周围血管、间质组织不断向异体骨中央侵入, 异体骨不断吸收、新骨形成的过程; 还有移植骨周围间充质细胞和成骨细胞随着组织液, 通过原有骨小管及骨营养血管到达移植骨中央实现成骨的过程。由此可见, 同种异体骨移植在体内的愈合是通过“全方位”的爬行替代而实现异体骨活化的过程。由此可见同种异体骨移植后在体内主要起的是支架作用<sup>[27-31]</sup>。

冻干处理的同种异体骨成骨速度慢, 这主要是冻干处理后的皮质骨仍然较致密, 周围的细胞和营养物质较难侵入内部。为了便于细胞和营养物质的侵入, 可制造一定孔隙, 但制造一定孔隙后, 生物力学强度势必会下降, 下降后的强度是否能够满足临床修复重建的力学要求呢? 从本实验结果看, 处理后的冻干骨强度是能够满足下颌骨修复重建力学要求的。

本实验从组织病理、扫描电镜及生物力学对冻干骨进行了检测, 证实冻干处理的下颌骨杀死了骨组织内的活细胞, 降低了其免疫原性, 同时还能完整保存骨组织的结构和一定的生物力学强度, 使其可能成为骨组织工程支架。同种异体骨与自体骨有相似解剖外形和生物学特性, 冻干处理的同种异体骨制作技术成熟、安全、不需要免疫抑制剂; 材料来源丰富; 不需降解, 爬行替代即为自体骨; 同时经冻干的同种异体骨仍含有骨形态发生蛋白和胶原, 能促进骨细胞的分化; 同种异体骨同时提供良好的细胞外基质和生长因子。因此, 同种异体骨应该是一较佳的生物支架材料。总之, 经过水化处理后冷冻干燥犬下颌骨仍然可以保持良好的外形并能提供较好的支持能力, 可以作为下颌骨及髁突修复重建的支架材料。

**致谢:** 首先感谢胡敏教授在作者读博后期间的悉心指导和帮助, 以及解放军总医院、解放军军医进修学院口腔医学博士后流动站的大力支持!

**作者贡献:** 刘昌奎进行实验设计, 实验实施, 实验评估为胡敏教授, 资料收集为谭新颖, 成文为景彩霞, 刘昌奎审校并对文章负责。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 动物实验获得所在单位的伦理委员会批注。

**学术术语:** 异体骨-是重建肿瘤切除后骨缺损的重要方式之一, 一般分为结构植骨和填充植骨。其优点是: 取材广泛, 用量不受限制; 结构植骨时可获得与患者切除骨相似的结构; 愈合后可获得较好功能。其缺点是: 不能获得即刻稳定, 需要等待骨愈合时间; 存在异体骨排斥、吸收、不愈合可能。人体对于任何非自体的植入物都存在排斥, 异体骨也不例外。异体骨再植入人体前会经过相应的处理, 减少其抗原性, 以减少排斥的发生。但仍有一些患者出现异体骨排斥反应, 且因个体差异不同, 排斥反应强弱也不同。一些患者仅出现发热、伤口周围轻微红肿反应, 经过保守治疗一般可好转。一些患者会出现伤口局部红肿、伤口渗液、伤口不愈合, 往往需要手术清创, 甚至一部分严重排斥患者需要将异体骨取出。异体骨在植入人体后有可能会被人体吸收, 但较少发生。

**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] Rogers SN, Lakshmiah SR, Narayan B, et al. A Comparison of the long-term morbidity following deep circumflex iliac and fibula flaps for reconstruction following head and neck cancer. *Plast Reconstr Surg*.2003;112(6):1517-1525.
- [2] Bullens PH, Minderhoud NM, de Waal Malefijt MC, et al. Survival of massive allografts in segmental defect reconstructions. *Int Orthop*.2009;33(3):757-760.
- [3] Drosse I, Volkmer E, Capanna R, et al. Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury*.2008;39 Suppl 2:S9-20.

- [4] Hutmacher, DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*.2000;21:2529-2543.
- [5] Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*.2005;26(27):5474-5491.
- [6] Lee J, Sung H, Jang JD, et al. Successful reconstruction of 15-cm segmental defects by bone marrow stem cells and resected autogenous bone graft in central hemangioma. *J Oral Maxillofac Surg*.2010;68:188-194.
- [7] Messori MR, Nagata MJ, Fucini SE, et al. Effect of platelet-rich plasma on the healing of mandibular defects treated with bone allograft. A radiographic study in dogs. *J Oral Implantol*. 2012;26: 1-21.
- [8] Rochanawutanon S, Suddhasthira T, Pairuchvej V, et al. Long term follow-up of reconstruction with allogeneic mandibular bone crib packed with autogenous particulate cancellous bone marrow. *Cell Tissue Bank*.2002;3(3):183-197.
- [9] 王忠东, 陈俊兰, 陈觉尧, 等. 个体化钛支架复合珊瑚羟基磷灰石和重组人骨形成蛋白2修复兔下颌骨缺损[J]. *中华口腔医学杂志*, 2012,6(4):19-21.
- [10] 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;31:4935-4943.
- [11] Ciocca L, Donati D, Ragazzini S, et al. Mesenchymal stem cells and platelet gel improve bone deposition within CAD-CAM custom-made ceramic HA scaffolds for condyle substitution. *Biomed Res Int*.2013;2013:549762.
- [12] Yuan J, Cui L, Zhang WJ, et al. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials*.2007;28:1005-1013.
- [13] Fan JB, Park H, Lee MK, et al. Adipose-derived stem cells and BMP-2 delivery in chitosan-based 3D constructs to enhance bone regeneration in a rat mandibular defect model. *Tissue Eng A*.2014;3(4):530-540.
- [14] Ren J, Ren TB, Zha P, et al. Repair of mandibular defects using MSCs-seeded biodegradable polyester porous scaffolds. *J Biomater Sci Polymer Edn*. 2007;18(5):505-517.
- [15] Chanchareonsook N, Tideman H, Feinberg SE, et al. Segmental mandibular bone reconstruction with a carbonate-substituted hydroxyapatite-coated modular endoprosthetic poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffold in Macaca fascicularis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*.2014;102(5):962-976.
- [16] Matsuo A, Takahashi H, Abukawa H, et al. Application of custom-made bioresorbable raw particulate hydroxyapatite/poly-L-lactide mesh tray with particulate cellular bone and marrow and platelet-rich plasma for a mandibular defect: Evaluation of tray fit and bone quality in a dog model. *J Craniomaxillofac Surg*.2012;40:453-460.
- [17] Zhao J, Zhang ZY, Wang SY, et al. Apatite-coated silk fibroin scaffolds to healing mandibular border defects in canines. *Bone*.2009;45:517-527.
- [18] Xi Q, Bu RF, Liu HC, et al. Reconstruction of caprine mandibular segmental defect by tissue engineered bone reinforced by titanium reticulum. *Chin J Traumatol*.2006;9(2):67-71.
- [19] Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, et al. Growth and transplantation of a custom vascularized bone graft in a man. *Lancet*.2004;364(9436):766-770.
- [20] Warnke PH, Wiltfang J, Springer I, et al. Man as living bioreactor: Fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials*.2006;27:3163-3167.
- [21] Vossen M, Edelstein J, Majzoub RK, et al. Bone quality and healing in a swine vascularized bone allotransplantation model using cyclosporine based immunosuppression therapy. *Plast Reconstr Surg*.2005;115(2):529-538.
- [22] 徐麟皓, 王丽娜, 朱一苗, 等. 同种异体骨制备保存研究进展[J]. *国际骨科学杂志*, 2008,29(5):320-321.
- [23] 李孜壮, 卢世璧. 冷冻干燥骨库的临床应用[J]. *制冷*, 1995,14(2):67-69.
- [24] Enneking WF, Campanacci DA. Retrieved human allograft: a clinicopathological study. *J Bone Joint Am*.2001;83-A(7):971-986.
- [25] 侯树勋. 同种异体组织移植在骨科应用的现状和前景[J]. *中华医学信息导报*, 2012,27(3):16.
- [26] 黄长明, 王臻, 董星杰, 等. 大段同种异体骨移植愈合的实验研究[J]. *骨与关节损伤杂志*, 2000,15(5):355-358.
- [27] Te Stroet MA, Rijnen WH, Gardeniers JW, et al. The outcome of femoral component revision arthroplasty with impaction allograft bone grafting and a cemented polished Exeter stem: A prospective cohort study of 208 revision arthroplasties with a mean follow-up of ten years. *Bone Joint J*.2015;97-B(6):771-779.
- [28] Venkatramani H, Sabapathy SR, Dheenadayalan J, et al. Reconstruction of post-traumatic long segment bone defects of the lower end of the femur by free vascularized fibula combined with allograft (modified Capanna's technique). *Eur J Trauma Emerg Surg*.2015;41(1):17-24.
- [29] Zhou G, Zhang Y, Zeng L, et al. Should thorough Debridement be used in Fibular Allograft with impaction bone grafting to treat Femoral Head Necrosis: a biomechanical evaluation. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015;16(1):140.
- [30] Reddy PK, Bolla V, Koppolu P, et al. Long palatal connective tissue rolled pedicle graft with demineralized freeze-dried bone allograft plus platelet-rich fibrin combination: A novel technique for ridge augmentation - Three case reports. *J Indian Soc Periodontol*.2015;19(2):227-231.
- [31] Paknejad M, Rokn A, Rouzmeh N, et al. Histologic evaluation of bone healing capacity following application of inorganic bovine bone and a new allograft material in rabbit calvaria. *J Dent (Tehran)*.2015;12(1):31-38.