

# 异种脱钙骨基质联合骨髓间充质干细胞植入豚鼠鼓泡腔增强成骨作用\*★

段礼府<sup>1</sup>, 王海涛<sup>2</sup>, 李化静<sup>1</sup>, 马艳<sup>3</sup>, 刘立中<sup>1</sup>

## Enhanced osteogenesis of implantation of heterogeneous demineralized bone matrix combined with bone marrow mesenchymal stem cells into the tympanic bullas of guinea pigs

Duan Li-fu<sup>1</sup>, Wan Hai-tao<sup>2</sup>, Li Hua-jing<sup>1</sup>, Ma Yan<sup>3</sup>, Liu Li-zhong<sup>1</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Currently, there are studies on the related applications of demineralized bone matrix and bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in orthopedic surgery and craniofacial reconstruction. However, the application in mastoid obliteration is still unclear.

**OBJECTIVE:** To explore the osteogenic effectiveness of heterogeneous demineralized bone matrix combined with BMSCs implanted into the mastoid cavity.

**METHODS:** Inbred female guinea pig BMSCs were isolated with the whole bone marrow adherent culture method, and the demineralized bone matrix was prepared with cancellous bone of bovine femoral head. Twenty guinea pigs were equally divided into two groups: the experimental group was implanted by demineralized bone matrix combined with BMSCs into the tympanic bulla, and the control group was treated with implantation of autologous iliac into the tympanic bulla.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The new bone quantity in the two groups had no significant difference at 1 month after implantation; 2 months later, the new bone quantity in the experimental group was significantly higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). It is indicated that the implantation of heterogeneous demineralized bone matrix combined with BMSCs into the mastoid cavity can effectively promote the osteogenesis after mastoid obliteration.

Duan LF, Wan HT, Li HJ, Ma Y, Liu LZ. Enhanced osteogenesis of implantation of heterogeneous demineralized bone matrix combined with bone marrow mesenchymal stem cells into the tympanic bullas of guinea pigs. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(3): 434-437. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; <sup>2</sup>Imaging Center, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; <sup>3</sup>Medical Research Center, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Duan Li-fu★, Studying for master's degree, Department of Otorhinolaryngology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China  
1458668171@qq.com

Correspondence to: Liu Li-zhong, Doctor, Professor, Department of Otorhinolaryngology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China  
lulizhongno.1@163.com

Supported by: Graduate Innovation Foundation of Xinjiang Medical University, No. MCR010-7\*

Received: 2011-07-29  
Accepted: 2011-10-20

### 摘要

**背景:** 目前在矫形外科和颅面重建中已有脱钙骨基质和骨髓间充质干细胞的相关应用, 但用于乳突腔填塞尚缺乏研究。

**目的:** 探寻异种脱钙骨基质和骨髓间充质干细胞联合植入乳突腔的成骨效能。

**方法:** 全骨髓贴壁培养法分离近交系雌性豚鼠骨髓间充质干细胞, 牛股骨头松质骨制备牛骨髓脱钙骨基质。20只豚鼠随机数字表法分为脱钙骨基质与骨髓间充质干细胞联合植入鼓泡腔的实验组和取自体髂骨植入鼓泡腔的对照组。

**结果与结论:** 植入1个月后两组的成骨量差异无显著性意义; 植入后2个月实验组成骨量多于对照组, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。说明异种脱钙骨基质与骨髓间充质干细胞联合植入乳突腔能有效促进乳突填塞后骨的形成。

**关键词:** 异种脱钙骨基质; 骨髓间充质干细胞; 颅面重建; 乳突填塞; 自体骨移植

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.03.012

段礼府, 王海涛, 李化静, 马艳, 刘立中. 异种脱钙骨基质联合骨髓间充质干细胞植入豚鼠鼓泡腔增强成骨作用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(3):434-437. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

中耳胆脂瘤具有侵蚀性可导致严重的颅内、外并发症, 手术为主要治疗方式, 为了降低复发率通常需要开放式乳突手术以彻底清除病灶, 但治疗后开放性空腔所致的并发症高达10%<sup>[1]</sup>, 包括: 听觉丧失、不干耳、反复感染、需要定期清理术腔等。针对一个大的骨性空腔, 填塞技术能有效解决这一问题<sup>[2-4]</sup>。而传统技术首选骨性材料进行修复, 临床上对骨组织的巨大需求与供给的矛盾, 促使开发组织工程技术用于骨的重建和修复<sup>[5]</sup>。

在矫形外科和颅面重建中已有异种脱钙骨基质和骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)的相关应用, 但用于乳突

腔填塞尚缺乏研究<sup>[6-7]</sup>。

实验为了明确BMSCs与异种脱钙骨基质颗粒联合植入, 用于开放式乳突手术后乳突腔填塞的有效性, 选用豚鼠作动物模型, 采用无创性对骨有良好显示的CT扫描进行检测。Vercruyssen等<sup>[8]</sup>就曾用CT对51例因中耳胆脂瘤进行开放式乳突手术+用自体骨皮质进行乳突腔填塞术的患者进行平均76.4个月的随访, 对胆脂瘤复发及填塞乳突腔的稳定性进行观察。

## 1 材料和方法

**设计:** 动物实验观察。

**时间及地点:** 于2010-08/2011-06在新疆医科大学第一附属医院医学研究中心干细胞室和实验动物科学研究部完成。

**材料:** 分两次选取近交系、雌性、清洁级豚鼠 24 只, 体质量 250~300 g。首先选用豚鼠 4 只, 待干细胞分离、纯化完成后再选取 20 只用于造模实验, 豚鼠由新疆医科大学实验动物中心提供, 伦审号: A-2010102007。

豚鼠每只单独饲养在消毒笼具中, 所完成动物实验的实验室于 2009-06-19 取得 AAALAC 认证。

#### 方法:

**豚鼠 BMSCs 的制备:** 首选 4 只豚鼠腹腔注射氯胺酮(100 mg/kg)执行安乐死, 取股骨、胫骨, 用全骨髓贴壁培养法分离 BMSCs, 扩增、纯化至第 3 代收获细胞备用。本课题前期研究鉴定该细胞群具有间充质干细胞的“干性”<sup>[9]</sup>。

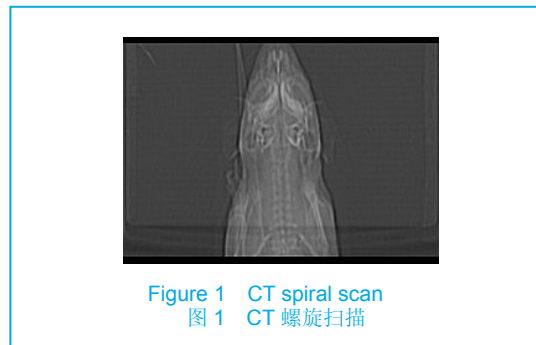
**牛髂骨脱钙骨基质的制备:** 按 Li 等<sup>[6]</sup>描述的方法制备, 在乌鲁木齐市屠宰场取健康牛的股骨头松质骨, 切割成 2 mm<sup>3</sup>的颗粒, 用大量热水清洗(50~55 °C), 用 1:1 的氯仿/甲醇脱脂、体积分数 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 脱蛋白、0.6 mol/L HCl 部分脱钙, 制备成脱钙骨基质颗粒。

**动物模型的制作:** 用显微镜进行观察鼓膜完整的 20 只雌性豚鼠, 随机数字表法均分为实验组和对照组, 两组动物均选右侧鼓泡进行手术。

**实验组:** 耳周备皮, 经腹腔注射地西洋 6 mg/kg、氯胺酮 70 mg/kg、阿托品注射液 0.2 mg/kg 进行麻醉, 再用普鲁卡因注射到鼓泡局部软组织进行浸润麻醉, 沿耳后沟中、下 1/3 作切口, 制作以外耳道为其底的 1 cm×0.5 cm 的颞肌筋膜瓣, 暴露鼓泡外侧壁骨质, 用电钻(NCL-35MH serial no: 5090369)钻开骨壁, 用微型咬骨钳向周围扩大暴露鼓泡腔, 剥离骨壁黏骨膜。按 Mankani 等<sup>[10]</sup>描述的方法将扩增第 3 代 3.5×10<sup>6</sup> 个 BMSCs 与 150 mg 牛髂骨脱钙骨基质混合逐层植入鼓泡腔中, 压实至鼓膜平面, 用颞肌筋膜瓣覆盖, 可吸收明胶海绵进行填塞, 逐层缝合切口。

**对照组:** 麻醉方法与制备乳突空腔的方法同上, 同时在髂骨取骨处行局部浸润麻醉(手术中加注射全麻首次剂量的 1/2 麻药于腹腔中以延长麻醉时间), 取出髂骨分离周围骨膜及软组织, 直接切割制成 2 mm<sup>3</sup>的颗粒, 按上述方法植入并缝合切口。

**CT 扫描检测:** 分别于植入后 1, 2 个月将豚鼠腹腔注射地西洋注射液(6 mg/kg)镇静, 用 GE(Lightspeed)16 排螺旋 CT 进行螺旋扫描, 层厚 0.625, 140 kV, 260 mA, 见图 1。



**放射评分结果:** 按 Lane and Sandn 放射评分标准评分, 见表 1。

表 1 Lane and Sandn 评分标准  
Table 1 Lane and Sandn scoring criteria

Bone formation	Score
No new bone formation	0
≤ 25%	1
26%~50%	2
51%~75%	3
76%~100%	4

**主要观察指标:** 分别于植入后 1, 2 个月用 CT 螺旋扫描对植入豚鼠右侧鼓泡腔的异种脱钙骨基质联合骨髓间充质干细胞与异种脱钙骨基质的成骨量及成骨速度进行观察。

**统计学分析:** 两组间的死亡率用 2×2 列联表的确切概率法进行分析。按 Lane 和 Sandhu 评分系统进行评分<sup>[11]</sup>, 选择 CT 室与本实验无关的主治医师一名进行独立评分, 评分时不告知组别, 从第一张能辨别鼓泡腔的 CT 片开始, 连续评定 3 张片, 取总分进行统计分析, 用 SPSS17.0 进行两组间的秩和检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 实验动物数量分析** 实验组豚鼠于植入后 1 周因感染死亡 1 只; 对照组分别于植入过程中出血量过多和植入 1 周后感染各死亡 1 只。经统计学分析两组死亡情况 2×2 列联表的确切概率法分析两组间死亡率无差别( $P=1.0$ ), 见表 2。

表 2 两组死亡情况  
Table 2 The death status of the two groups (n)

Group	Death status		Total
	Survival	Death	
Experimental	9	1	10
Control	8	2	10
Total	17	3	20

$P = 1.0$ , there was no significant difference between the two groups

新疆医科大学第一附属医院,<sup>1</sup>耳鼻喉科,<sup>2</sup>影像中心,<sup>3</sup>医学研究中心, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

段礼府★, 男, 1982 年生, 四川省南充市人, 汉族, 新疆医科大学在读硕士, 主要从事耳科组织工程与干细胞治疗研究。  
1458668171@qq.com

通讯作者: 刘立中, 博士, 教授, 新疆医科大学第一附属医院耳鼻喉科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054  
lulizhongno.1@163.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2012)03-00434-04

收稿日期: 2011-07-29  
修回日期: 2011-10-20  
(20110629001/D·L)

2.2 两组CT扫描结果 植入后1个月CT扫描显示, 实验组1只在植入物边缘有高密度影显示有新骨形成, 见图2。

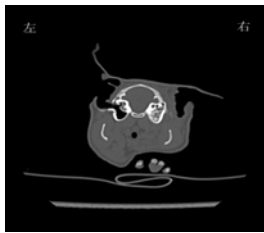


Figure 2 CT scan of the experimental group at 1 mon after implantation: high density shadow was seen in the edge of right bulla, and the left bulla was without any treatment

图2 植入后1个月实验组CT扫描: 右侧鼓泡边缘见高密度影, 左侧为未进行任何处理的鼓泡腔

对照组无新骨形成的影像。手术后2个月两组均有明显新骨形成, 鼓泡腔内均可见大量高密度骨组织影, 并与周围骨壁融合好, 见图3, 另外, 切口愈合良好, 鼓膜完整、外耳道无溢液。

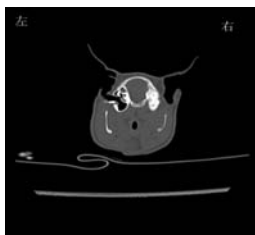


Figure 3 CT scan of the experimental group at 2 mon after implantation: high density shadow of the right bulla connected with the surrounding bone was seen, and the left bulla was without any treatment

图3 植入后2个月实验组CT扫描: 右侧鼓泡与周围骨质相连的高密度影, 左侧为未进行任何处理的鼓泡腔

2.3 两组放射评分结果 见表3。

表3 两组间成骨量评分及秩次  
Table 3 The new bone quantity scores and rank test results of the two groups

No.	Experimental group		Control group	
	New bone quantity score <sup>a</sup>	Rank	New bone quantity score	Rank
1	10	10.5	6	3.5
2	11	13	12	16
3	9	8.5	5	2
4	12	16	7	5.5
5	12	16	8	7
6	11	13	11	13
7	10	10.5	3	1
8	9	8.5	6	3.5
9	7	5.5		
	$n_1=9$	$T_1=101.5$	$n_2=8$	$T_2=51.5$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , the difference in the new bone quantity scores between the two groups was significant

按 Lane and Sandn 放射评分标准评分显示实验组成骨量明显优于对照组, 经统计学检验两组间差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

中耳胆脂瘤手术的目的是彻底清除病灶、防止复发、恢复耳的自净功能、保留或改善听力, 通常采用开放术式手术加一期或二期行乳突填塞<sup>[12]</sup>。目前多用于乳突腔的填塞材料包括自体肌瓣、骨膜瓣、肌肉、脂肪、软骨、骨屑及生物材料<sup>[13]</sup>。在所有的材料中自体骨因: 骨传导、骨生成及骨诱导作用能促进乳突腔内新骨生成, 达到恢复正常的骨结构及生理功能, 并作为骨移植的金标准<sup>[6]</sup>。然而, 自体骨因取材的有限性、取骨部位的二次损伤和明显延长手术时间而导致潜在风险, 使其应用受到限制<sup>[14]</sup>。因此, 在矫形外科中普遍使用同种异体和异种移植物替代自体移植物<sup>[15]</sup>。研究颇多的生物材料  $\beta$ -磷酸三钙和羟基磷灰石, 因具有骨传导及骨诱导作用已广泛用于骨重建, 但 Derald 等<sup>[16]</sup>将  $\beta$ -磷酸三钙用于重建外耳道后壁其吸收改周期长达 9 个月, 在此过程中可因覆盖物萎缩而导致材料脱出而使手术失败。Ridenour 等<sup>[17]</sup>对回顾性资料发现因羟基磷灰石骨水泥用于乳突腔填塞因其难吸收而导致 3 例严重并发症。因此将  $\beta$ -磷酸三钙和羟基磷灰石应用于乳突腔填塞及外耳道后壁重建军的可行性遭到质疑。基于此因, 为乳突腔填塞选择新的材料来源尤为重要。胡蕴玉等<sup>[18]</sup>将骨进行处理获得的脱钙骨基质不具有抗原性和传染性, 并能提供结构支持和长时间骨整合能力即骨传导性。然而, 脱钙骨基质单独应用于颅骨缺损需要至少 1 年的时间才能矿化<sup>[19]</sup>, 表明单一的脱钙骨基质, 修复骨缺损时间较长。BMSCs 是涵盖有具有成骨潜能和通过旁分泌和自分泌的作用促进成骨分化细胞的细胞群<sup>[20]</sup>, 能有效促进新骨形成, 也有一系列用于矫形外科的临床实验<sup>[21]</sup>。虽然 BMSCs 仅占骨髓单个核细胞的 0.001%~0.010%, 但其取材容易、对机体损伤小, 并能在体外分离纯化和大量扩增<sup>[22]</sup>。此外, BMSCs 的免疫原性弱, 进一步的研究显示 BMSCs 能抑制 T 淋巴细胞的增殖, 促进 B 淋巴细胞的存活<sup>[23]</sup>。Bergwerf 等<sup>[24]</sup>研究证实 BMSCs 移植到具有免疫力的同系基因型小鼠中枢神经系统具有免疫耐受性。这就为在具有免疫力的小动物, 开展同种异体 BMSCs 的相关研究提供了理论基础。

为此, 本实验遵从生成具有良好骨传导的骨必须具有促进骨形成(骨生成作用)和提供结构性支持(骨传导作用)的 2 个主要功能原则<sup>[18]</sup>。结合了 BMSCs 的成骨作用及脱钙骨基质的骨传导作用, 将二者联合植入豚鼠鼓泡腔。由于颞骨结构复杂及局部重叠较多, 为了更好的显示新骨形成, 实验采用 CT 观察其成骨效能, 因为 CT



具有密度分辨率高, 能清晰显示各种组织结构层次, 包括骨骼周围软组织及骨骼本身。与作为金标准的自体骨移相比较, 发现异种脱钙骨和 BMSCs 联合植入, 1 个月就观察到 1 例有明显的新骨形成, 植入后 2 个月实验组新骨形成明显优于对照组, 而单纯的自体骨移植成骨速度慢, 表明脱钙骨基质和 BMSCs 联合植入, BMSCs 不仅提供了促骨和成骨作用的细胞源, 而且在促进异种脱钙骨形成新骨中加速了自体骨细胞对异种骨材料形成骨的促进作用。加之, 用无创的方法对成骨的效能及与周围骨质整合情况进行观察是临床最易采纳的理想方式。

总之, BMSCs 联合脱钙骨基质作为乳突腔填充具有良好的新骨形成能力, 是开放式乳突术后用于乳突填充材料来源的理想选择。但豚鼠鼓泡腔面积与临床上中耳胆脂瘤的根治腔相比尚有距离, 并且, 随着手术时间的延长动物感染和死亡的风险增大已在本实验中显现。加之由于本实验只用 CT 扫描做了 2 个月的短期观察, 如要在临床上运用尚须进一步进行大动物及疾病模型动物实验予以全面论证。

**致谢:** 本实验在新疆医科大学第一附属医院医学研究中心干细胞室完成, 衷心感谢干细胞实验室马艳老师、毕晓娟老师在实验过程中给予的帮助和支持。

#### 4 参考文献

- [1] Chang CC, Chen MK. Canal-wall-down tympanoplasty with mastoidectomy for advanced cholesteatoma. *J Otolaryngol.* 2000; 29(5):270-273.
- [2] Lee WS, Choi JY, Song MH, et al. Mastoid and epitympanic obliteration in canal up mastoidectomy for prevention of retraction pocket. *Otol Neurotol.* 2005;26(6):1107-1111.
- [3] Vercruyse JP, De Foer B, Somers T, et al. Mastoid and epitympanic bony obliteration in pediatric cholesteatoma. *Otol Neurotol.* 2008;29(7):953-960.
- [4] Lee WS, Kim SH, Lee WS, et al. Canal wall reconstruction and mastoid obliteration in canal wall down tympanomastoidectomized patients. *Acta Otolaryngol.* 2009; 129(9):955-961.
- [5] Fröhlich M, Grayson WL, Wan LQ, et al. Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2008;3(4):254-264.
- [6] Li D, Bi L, Meng GL, et al. Multi-variety bone bank in China. *Cell Tissue Bank.* 2010;11(3):233-240.
- [7] Chanda D, Isayeva T, Kumar S, et al. Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in prostate cancer bone metastasis. *Clin Cancer Res.* 2009;15(23):7175-7185.
- [8] Vercruyse JP, De Foer B, Somers T, et al. Long-term follow up after bony mastoid and epitympanic obliteration: radiological findings. *J Laryngol Otol.* 2010;124(1):37-43.
- [9] Shi XL, Xie FL, Liu LZ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(8):1345-1349. 史筱璐, 谢凤莲, 刘立中, 等. 豚鼠 BMSCs 与纳米羟基磷灰石体外构建组织工程骨的实验研究[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(8):1345-1349.
- [10] Mankani MH, Kuznetsov SA, Marshall GW, et al. Creation of new bone by the percutaneous injection of human bone marrow stromal cell and HA/TCP suspensions. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(12):1949-1958.
- [11] Alexander JW. Bone grafting. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1987;17(4):811-819.
- [12] Huang XZ, Wang BJ. Beijing: The Publishing House of People's Health. 2004:856-857. 黄选兆, 汪宝洁. 实用耳鼻咽喉科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 856-857.
- [13] Dornhoffer JL. Surgical modification of the difficult mastoid cavity. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;120(3):361-367.
- [14] Pieske O, Wittmann A, Zaspel J, et al. Autologous bone graft versus demineralized bone matrix in internal fixation of ununited long bones. *J Trauma Manag Outcomes.* 2009;3:11.
- [15] Bostrom MP, Yang X, Kennan M, et al. An unexpected outcome during testing of commercially available demineralized bone graft materials: how safe are the nonallograft components? *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(13):1425-1428.
- [16] Derald E, Brackmann, Clough Shelton, et al. *Otologie Surgery, Second Edition.* Beijing: The Publishing House of People's Health. 2006:147-150.
- [17] Ridenour JS, Poe DS, Roberson DW. Complications with hydroxyapatite cement in mastoid cavity obliteration. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;139(5):641-645.
- [18] Hu YY. Beijing: The Publishing House of People's Health. 2006: 117-134. 胡蕴玉. 现代骨科基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社. 2006: 117-134.
- [19] Por YC, Barceló CR, Salyer KE, et al. Bone generation in the reconstruction of a critical size calvarial defect in an experimental model. *J Craniofac Surg.* 2008;19(2):383-392.
- [20] Salem HK, Thiemeermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells.* 2010;28(3): 585-596.
- [21] Shenaq DS, Rastegar F, Petkovic D, et al. Mesenchymal Progenitor Cells and Their Orthopedic Applications: Forging a Path towards Clinical Trials. *Stem Cells Int.* 2010;2010:519028.
- [22] Xie C, Reynolds D, Awad H, et al. Structural bone allograft combined with genetically engineered mesenchymal stem cells as a novel platform for bone tissue engineering. *Tissue Eng.* 2007;13(3):435-445.
- [23] Musso A, Zocchi MR, Poggi A. Relevance of the mevalonate biosynthetic pathway in the regulation of bone marrow mesenchymal stromal cell-mediated effects on T cell proliferation and B-cell survival. *Haematologica.* 2011;96(1):16-23.
- [24] Bergwerf I, De Vocht N, Tambuyzer B, et al. Reporter gene-expressing bone marrow-derived stromal cells are immunotolerated following implantation in the central nervous system of syngeneic immunocompetent mice. *BMC Biotechnol.* 2009;9:1.

#### 来自本文课题的更多信息—

**基金资助:** 新疆医科大学研究生创新基金(MCR010-7)。

**伦理批准:** 本实验已由新疆医科大学第一附属医院实验动物伦理审核委员会审核通过。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**本文创新性:** 本实验通过骨髓间充质干细胞的成骨作用及脱钙骨基质的骨传导作用, 将其植入豚鼠鼓泡腔用 CT 观察其成骨效能, 并与作为金标准的自体骨移相比较。这在目前还没有相关研究报道。