

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201301029

· 综述 ·

骨髓基质干细胞移植与老年性 耳聋的相关性研究

王亮亮 综述,刘强和 审校

(桂林医学院附属医院 耳鼻咽喉科,广西 桂林 541001)

关键词:老年;耳聋;骨髓基质干细胞;移植

中图分类号:R764.43

文献标识码:C

文章编号:1007-1520(2013)01-0089-04

老年性耳聋是伴随年龄老化(一般发生在60岁以上)而发生的听觉系统退行性变导致的耳聋,主要为感音神经性聋,它的发生与耳部微血管退化、耳蜗病变、听觉神经元、听觉中枢、听觉传入传出神经通路及全身机能退化密切相关,但是,目前国内外学者普遍认为耳蜗螺旋神经节细胞或者耳蜗毛细胞的萎缩退变是老年聋的关键因素^[1-3]。彭斌等^[4]的研究说明耳蜗底回的传出神经末梢已受到年龄的影响,这种影响可能源自老化导致的外毛细胞的缺失,因为毛细胞是对听神经元的发生和保持正常起着重要作用的多种营养因子的来源。所以,毛细胞的缺失必然会使听神经纤维和听神经元变性。由此可见,抑制耳蜗毛细胞和耳蜗螺旋神经节细胞的退变对老年性耳聋的防治有重要价值。目前老年性耳聋的药物治疗和外科手术治疗只能改善部分症状,长期疗效并不乐观^[5]。近年来,随着对疾病细胞分子水平研究的不断深入,细胞移植的替代治疗成为探索疾病治疗的新途径并被大量关注。而骨髓基质干细胞(bone marrow stromalstem cells, BMSC)以其自我更新^[6]和多向分化能力^[7]被广泛应用于移植研究中,特别是对于一些中枢神经系统损伤及退化性病变,更是成为研究的热点。

1 BMSC 的特性

BMSC 作为探讨细胞水平治疗疾病的主要来源之一,具有其自身的优势,如分化潜能好、来源丰富、不存在胚胎干细胞移植所带来的伦理学问题,又可用于自体移植,免除了宿主可能的免疫排斥反应,具有良好的应用前景^[8]。近年来,随着对分子生物学研究的不断深入,人们发现骨髓中除造血干细胞外,还存在 BMSC。BMSC 是中胚层分化而成的非造血成体干细胞,在体外培养时表现出胚胎干细胞的增殖能力和多向分化潜能。它可分化为各种类型的间充质细胞,在适当的条件下, BMSC 也可跨胚层分化为非间充质细胞。近来 Jiang 等^[9]研究表明 BMSC 还能产生神经细胞。因此, BMSC 也许可以用来移植以恢复损伤或者萎缩的毛细胞及螺旋神经节的功能。

在生理稳态情况下,体内大多数 BMSC 增殖不明显,但在体外补充适量血清的培养液中,它们能贴壁生长,表现出旺盛的有丝分裂活动和增殖能力,同时能多次传代而保持细胞的表型不变。能够向内皮细胞、外胚层和中胚层分化,植入无损伤的组织能与宿主细胞稳定嵌合。与胚胎干细胞相比, BMSC 有良好的内在组织相容性,能广泛迁移,与周围组织整合而发挥功能,在有免疫缺陷的小鼠体内不产生

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81060083),广西科技厅技术与开发项目(桂科攻 10124001B-56)。

作者简介:王亮亮,男,硕士研究生,住院医师。

通讯作者:刘强和, Email: wljy80@163.com.

肿瘤,植入反应弱。此外,BMSC 在体外能被神经营养因子诱导分化为多种成体细胞,分泌一系列细胞因子,促进神经元生长发育,因此被视为多种组织细胞移植的替代来源及基因治疗的有效运载工具,已成为细胞移植与基因治疗领域中的研究热点。选择 BMSC 的原因除了它具有以上优点外,还因为它易于收集培养,也能够进行自体移植,可有效地避免或减轻免疫排斥反应;在人体内也易进行操作,具有很强的实用性。可见 BMSC 移植治疗退行性变引起的疾病有很大的应用潜力,也因此代表了一种有潜能的新的治疗神经系统疾病的策略。

2 BMSC 的分离培养

目前常用的分离方法主要有 3 种,即密度梯度离心法、贴壁培养筛选法及流式细胞仪分选法^[10]。其中密度梯度离心法具有操作简便,所得 BMSC 纯度较高、对活性影响小等特点被广泛应用。贴壁培养筛选法操作简单,但获得的 BMSC 纯度低、混杂细胞较多。流式细胞仪法目前尚未广泛应用。BMSC 的培养目前多采用贴壁细胞培养法。培养条件多采用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 L-DMEM 培养基,置于 37%、5% CO₂、80% 湿度的培养箱内培养。

3 BMSC 移植途径及在老年性耳聋中的应用

3.1 BMSC 的移植途径

目前内耳干细胞移植途径有鼓阶注射^[11-12]、中阶注射^[13]、半规管开窗注射^[14]、蜗轴注射^[15-17]等方法,而 BMSC 内耳移植的文献较少,相关文献提示主要是鼓阶注射和蜗轴注射。

3.2 BMSC 内耳移植

内耳作为一特殊器官,存在着内外淋巴循环,并且仅通过耳蜗导水管与脑脊液相连通,因此在结构上相对独立,为近年来内耳转基因治疗提供了解剖学基础。有观点认为,外淋巴腔和蜗轴的解剖屏障可能对 BMSC 的迁移起阻隔作用,所以更倾向于蜗轴注射,但 Sharif 等^[11]通过鼓阶注射 BMSC,发现移植细胞除主要分布在鼓阶外,还能迁移到螺旋韧带、骨螺旋板缘、感觉上皮、听神经等部位。用神经干细胞

通过鼓阶移植使药物进入聋豚鼠耳蜗内,可以看到移植细胞可以沿着蜗轴的听神经分布并接近感觉上皮区^[18]。可以推断外淋巴腔和蜗螺旋管的解剖屏障之间可能存在着一种供细胞通过的微小通道,使鼓阶注射的干细胞可以沿着该通道到达螺旋神经节,并顺着神经纤维到达 corti 氏器附近。

对于内耳这一特殊结构,以前细胞移植替代治疗的研究多局限于直接注射神经营养因子或以病毒载体、脂质体转染神经营养因子基因到耳蜗,也有经脑脊液途径的相关报道^[19],但以上载体的安全性、表达特性及效应等问题均有待解决。BMSC 的选取、培养方法、分化为神经细胞的效率、移植位点、细胞的数量、脑中内源性因子的作用以及 BMSC 在脑内存活时间对移植疗效均有一定的影响。鲁玲玲等^[20]的实验采用复制缺陷型腺相关病毒载体介导的基因转染方法将 BMSC 改造成携带酪氨酸羟化酶基因的工程细胞,经 X-gal 染色和酪氨酸羟化酶免疫组化检测,转染效率为 70% 以上,表明 BMSC 易于接受并表达外源基因,可促进多巴胺的合成或在脑内定向诱导分化为多巴胺能神经元。2003 年日本学者 Iguchi 等^[14]将来源于绿色荧光转基因鼠的神经干细胞经半规管途径移植入 C57/BL6 小鼠内耳中,28 d 后发现干细胞存活,并且已转化为神经胶质细胞,能够分泌脑源性神经营养因子及胶质细胞神经营养因子。说明细胞移植不仅在身体其他组织器官可行,而且在内耳这一特殊器官也是可行的。不过,由于胚胎和神经干细胞取材困难,在临床上的应用将受到限制。葛圣雷等^[12]选用具有良好的生物活性与多向分化潜能的 BMSC,进行内耳移植探索性研究,发现移植的 BMSC 在耳蜗鼓阶成活并贴壁生长,取得可喜的成果。

3.3 BMSC 在老年性耳聋中的应用

老年性耳聋是一种随着年龄增长而出现的退行性病变,其关键是听神经元的老化以及凋亡,寻找一种阻滞其退化或者凋亡的治疗手段成为治疗该疾病的主要研究方向,Jeon 等^[21]在体外条件下利用生长因子和 Math1,发现骨髓间充质干细胞能够被诱导成类毛细胞,而 Jessica 将小鼠骨髓间充质干细胞用包含有 GFP、Math1 和毛细胞间蛋白的质粒转染后移植到鸡

胚中,结果显示移植细胞在鸡胚中存活,其中一些细胞融合到耳周间充质,但不表达任何毛细胞标记物。但有研究证明将含有 *Math1* 基因的 BMSC 移植至耳蜗后,可以看到基底膜支持细胞及邻近非感觉上皮细胞表达 *Math1* 蛋白,分化为类毛细胞,蜗轴的听神经轴突向新生的毛细胞生长并检测到新生毛细胞有助于听力提高^[22]。Iwai 等^[23] 研究显示 BMSC 移植能够阻止老年性耳聋毛细胞和螺旋神经节细胞的凋亡。Kamiya 等^[24] 采用线粒体毒素造成大鼠耳蜗局部纤维细胞的急性凋亡,然后将培育的 BMSC 灌注到受损耳蜗小鼠内耳外半规管,结果发现移植后的 BMSC 在耳蜗内发生迁移,在损伤区域外侧壁检测到移植细胞,检测听力有显著性提高。同样证明了 BMSC 移植治疗老年性耳聋的成效显著,有文献研究表示神经生长因子(NGF)对豚鼠损伤的内耳毛细胞和螺旋神经节细胞有保护作用,Hu 等^[25] 将带有 NGF 的小鼠胚胎的背根神经节(DRG)细胞移植入耳蜗,发现其神经突穿过耳蜗骨质伸向耳蜗螺旋神经节,这一现象证明移植的胚胎神经节能融入到成年的听觉神经系统,进而很有可能治疗耳聋。作为耳蜗细胞替代治疗的目的主要是替代耳蜗内缺失的毛细胞、螺旋神经节细胞和非感觉细胞。研究表明 BMSC 能够向神经细胞、毛细胞^[26-27]、非感觉细胞分化。目前,通过 BMSC 移植来进行听力的功能性恢复已经建立,我们还需要进一步的研究来了解 BMSC 的移植后分化能力以及它们在内耳重建损失细胞中的可能应用^[28]。同时试想,将带有 NGF 基因的 BMSC 移植到耳蜗是否有更好的效果这值得我们进一步研究。

4 展望

神经系统疾病的细胞移植治疗就是将自体、同种异体或异种的有功能的细胞,经过加工处理后,移植到患者的脑内或脊髓内的特定区域,从而治疗某种神经疾病的方法。近年研究发现,细胞移植对宿主脑区破坏小,定位准,可重复注射,可准确计算植入细胞的数量,而且可以混合使用不同脑区、不同类型的细胞。BMSC 具有干细胞共有的特性以及神经干细胞和胚胎干细胞不具备的优点,被认为是组织工

程和细胞替代治疗中的最佳选择。尽管 BMSC 移植在老年性耳聋的研究方面取得了一定的进展,但是仍然存在一些问题:①如何使体外培养的 BMSC 能够更加稳定传代;②是否能够找到一种更好的方法提高移植后 BMSC 耳蜗内的成活率;③移植后的 BMSC 向耳蜗毛细胞及耳蜗螺旋神经节细胞分化数目、存活时间不确定,而且其是否有向肿瘤细胞发展的倾向;④ BMSC 移植治疗老年性耳聋长期疗效还需要进一步研究。构建神经生长因子基因修饰的 BMSC,同时将其移植入快速老化小鼠的耳蜗,并以此来探讨快速老化小鼠在听功能和耳蜗病理组织学变化等方面及移植效果方面的研究目前在国内外均未展开。但运用移植的方法治疗退化性疾病已成为一种新的研究方向。老年性耳聋严重威胁人类身心健康,随着我国步入老龄化社会,该疾病的发病人数处在上升阶段,针对老年性耳聋的细胞移植治疗的方法给该疾病的治疗带来了新的希望。

参考文献:

- [1] Seidman MD, Ahmad N, Bai U. Molecular mechanisms of age-related hearing loss [J]. *Ageing Res Rev*, 2002, 1 (3): 331-343.
- [2] 刘强和,罗香林,耿宛平,等. 快速老化小鼠的听功能和耳蜗螺旋神经元的增龄性变化[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2008, 22(3): 215-217, 221.
- [3] 刘强和,罗香林,耿宛平,等. 快速老化小鼠的听功能和耳蜗毛细胞的增龄性变化[J]. *华夏医学*, 2008, 21(2): 213-215.
- [4] 彭斌,周媛,谢鼎华. 增龄对年龄相关性听力减退大鼠听觉神经通路形态学的影响[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2008, 16(2): 103-106.
- [5] 全书林,王春梅. 降纤酶及高压氧治疗突聋的疗效[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2010, 16(3): 230-231.
- [6] Sila-Asna M, Bunyaratvej A, Maeda S, et al. Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell [J]. *Kobe JM ed Sci*, 2007, 53(1-2): 25-35.
- [7] Lin HT, Tarrg YW, Chen YC, et al. Using human plasma supplemented medium to cultivate human bone marrow-derived mesenchymal stem cell and evaluation of its multiple-lineage potential [J]. *Transplant Proc*, 2005, 37(11): 4504-4505.
- [8] Corti S, Nizzardo M, Nardim M, et al. Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy [J]. *Clin Invest*, 2008, 118

- (10): 3316 - 3330.
- [9] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 41 - 49.
- [10] 李娟, 刘黎青, 周盛年, 等. 骨髓基质干细胞移植治疗脑缺血的研究进展 [J]. *中国老年杂志*, 2010, 30(19): 2878 - 2880.
- [11] Sharif S, Nakagawa T, Ohno T, et al. The potential use of bone marrow stromal cells for cochlear cell therapy [J]. *Neuroreport*, 2007, 18(4): 351 - 354.
- [12] 葛圣雷, 谢鼎华, 朱钢华, 等. 骨髓基质干细胞豚鼠内耳移植初步观察 [J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2005, 13(3): 177 - 178.
- [13] Hildebrand MS, Dahl HH, Hardman J, et al. Survival of partially differentiated mouse embryonic stem cells in the scala media of the guinea pig cochlea [J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2005, 6(4): 341 - 354.
- [14] Iguchi F, Nakagawa T, Tateya I, et al. Trophic support of mouse inner ear by neural stem cell transplantation [J]. *Neuroreport*, 2003, 14(1): 77 - 80.
- [15] Okano T, Nakagawa T, Endo T, et al. Engraftment of embryonic stem cell-derived neurons into the cochlear modiolus [J]. *Neuro report*, 2005, 16(17): 1919 - 1922.
- [16] Naito Y, Nakamura T, Nakagawa T, et al. Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlear of chinchillas [J]. *Neuroreport*, 2004, 15(1): 1 - 4.
- [17] Matsuoka AJ, Kondo T, Miyamoto RT, et al. In vivo and in vitro characterization of bone marrow-derived stem cells in the cochlear [J]. *Laryngoscope*, 2006, 116(8): 1363 - 1367.
- [18] Hu Z, Wei D, Johansson CB, et al. Survival and neural differentiation of adult neural stem cells transplanted into the mature inner ear [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 302(1): 40 - 47.
- [19] 高下, 王锦玲, 杨安钢, 等. NT3 基因工程细胞经脑脊液途径的耳蜗内生物学效应的初步证明 [J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2002, 10(4): 255 - 257, 279.
- [20] 鲁玲玲, 苏玉金, 赵春礼, 等. 骨髓基质细胞的分离、鉴定以及 TH 基因的转染与表达 [J]. *生物化学与生物物理学报*, 2003, 35(6): 536 - 535.
- [21] Jeon SJ, Oshima K, Heller S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are progenitors in vitro for inner ear hair cells [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2007, 34(1): 59 - 68.
- [22] Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, et al. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals [J]. *Nat Med*, 2005, 11(3): 271 - 276.
- [23] Iwai H, Lee S, Inaba M, et al. Prevention of accelerated presbycusis by bone marrow transplantation in senescence accelerated mice [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2001, 28(4): 323 - 328.
- [24] Kamiya K, Fujinami Y, Hoya N, et al. Mesenchymal stem cell transplantation accelerates hearing recovery through the repair of injured cochlear fibrocytes [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(1): 214 - 226.
- [25] Hu Z, Vlfendall M, Vlivius NP. NGF Stimulates extensive neurite out growth from implanted dorsal root ganglion neurons follow ingtrans plantation into the adult rat inner ear [J]. *Neurobiol Dis*, 2005, 18(1): 184 - 192.
- [26] Kondu T, Johnson SA, Yoder MC, et al. Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow - derived pluripotent stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(13): 4789 - 4794.
- [27] Jeon SJ, Oshima K, Heller S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are progenitors in vitro for inner ear hair cells [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2007, 34(1): 59 - 68.
- [28] 秦贺, 杨仕明, 翟所强. 骨髓间充质干细胞治疗感音神经性聋的基础研究进展 [J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2009, 16(1): 24 - 26.

(修回日期: 2012 - 08 - 10)

(上接第 88 页)

- [11] Romano A, Chibbaro S, Marsella M, et al. Combined Endoscopic Transsphenoidal - Transventricular Approach for Resection of a Giant Pituitary Macroadenoma [J]. *World Neurosurg*, 2010, 74(1): 161 - 164.
- [12] Yang I, Wang MB, Bergsneider M. Making the Transition from Microsurgery to Endoscopic Trans - Sphenoidal Pituitary Neurosurgery [J]. *Neurosurg Clin N Am*, 2010, 21: 643 - 651.
- [13] 谭国林, 贺湘湘, 陈江波, 等. 鼻内镜下经鼻中隔后-蝶窦入路切除累及鞍外的鞍区肿瘤 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2011, 17(5): 351 - 354.
- [14] 王剑新, 漆松涛, 彭玉平, 等. 分期经蝶入路手术治疗向鞍上生长的垂体无功能巨腺瘤的临床价值 [J]. *中国全科医学*, 2011, 14(2): 622 - 624.
- [15] Barzaghi LR, Losal M, Giovanelli M, et al. Complications of transsphenoidal surgery in patients with pituitary adenoma: experience at a single centre [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2007, 149: 877 - 886.
- [16] Zhao B, Wei YK, Li GL, et al. Extended transsphenoidal approach for pituitary adenomas invading the anterior cranial base, cavernous sinus, and clivus: a single-center experience with 126 consecutive cases [J]. *J Neurosurg*, 2010, 112: 108 - 117.
- [17] 孙艳, 邱前辉, 刘辉, 等. 颈内动脉颅底段重要解剖标志点的影像学测量 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2010, 16(2): 81 - 85.
- [18] 谢天浩, 骆纯. 糖皮质激素在垂体瘤围手术期应用的研究进展 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2012, 18(2): 161 - 164.

(修回日期: 2012 - 11 - 15)