

文章编号: 1004-0374 (2009) 02-0222-04

## 干细胞治疗感音神经性耳聋

李华伟\*, 王正敏

(复旦大学附属眼耳鼻喉科医院, 复旦大学生物医学研究院, 上海 200032)

**摘要:** 治疗内耳疾病的主要困难之一是找到耳蜗毛细胞或者螺旋神经元丢失所导致的听力损失的治疗方法。本文讨论使用干细胞替代感觉细胞丢失为目的的几个治疗策略。作者最近在成年内耳中发现了可以分化为毛细胞的干细胞, 发现了胚胎干细胞可在体外转化为毛细胞并表达毛细胞标记物。在动物模型中, 成年内耳干细胞、神经干细胞和胚胎干细胞来源的前体细胞可分化成为毛细胞和神经细胞。本文将讨论使用干细胞再生损伤毛细胞的不同方法, 介绍几种可行的动物模型, 并讨论发展基于干细胞的细胞替代疗法治疗内耳损伤中存在的困难。

**关键词:** 内耳; 干细胞; 毛细胞; 耳聋; 听觉

**中图分类号:** R764.431; Q813 **文献标识码:** A

## Stem cells in therapy for hearing loss

LI Hua-wei\*, WANG Zheng-min

(Department of Otolaryngology, Shanghai Medical School of Fudan University, Institute of Biomedical Sciences of Fudan University, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** One of the greatest challenges in treatment of inner ear disorders is to find a cure for hearing impairment that is caused by loss of cochlear hair cells or spiral ganglion neurons. Here we discuss different starting points for the development of therapeutic strategies with focus on using stem cells to replace lost sensory cells. We have recently identified stem cells in the adult inner ear that gave rise to hair cells and we have shown that embryonic stem cells can be converted to cells that express hair cell markers in vitro. In animal models, hair cells and neural cell types can be generated by transplantation of progenitor cells derived from adult inner ear and neural stem cells as well as from embryonic stem cells. We discuss different approaches toward using stem cells to regenerate the damaged inner ear, we introduce potential animal models, and we point out potential obstacles that translational research has to overcome in the development of stem cell-based cell replacement therapies for the damaged inner ear.

**Key words:** inner ear; stem cell; hair cell; deafness; hearing

听觉在我们与周围环境的互相交流中是必不可少的, 但很多种有害因素能损害内耳组成细胞。所有的听觉感知都是通过每个内耳中不超过15 000个感觉细胞的输出得来的。这些感觉细胞, 即毛细胞, 是内耳的机械-电换能器。毛细胞顶端静纤毛束的偏曲引起毛细胞基底外侧的递质释放, 从而引起听神经纤维产生神经电位。

大部分类型的先天性和获得性听力损失由耳蜗毛细胞或相关神经元的损伤或丢失引起。遗传性聋

的发病率很高: 每一千个儿童中有一个出生时就患有耳聋, 另外有千分之一在成年以前发生耳聋。根据发病年龄不同, 听力损伤会影响语言、认知和心理的学习和发展。随着世界人口的逐渐增加, 老龄化的日益严重, 噪音污染的加重, 获得性听力损伤的患病率一直在上升。据统计, 65岁以上的成年

收稿日期: 2008-12-15

\*通讯作者: hwli@shmu.edu.cn

人中三分之一患有残疾性听力损伤, 使耳聋成为最常见的慢性疾病之一。2001年全球有超过2 500万人患有耳聋。

过去几年中, 干细胞被引入哺乳动物毛细胞再生新途径的研究领域。使用干细胞替代内耳细胞的治疗法一个重要进展是近期发现了胚胎干细胞、成年内耳干细胞以及神经干细胞均可在体内培养分化成毛细胞。这些干细胞是多向性的, 理论上, 这些细胞可以分化出内耳中所有类型的细胞。我们认为, 以干细胞为基础的治疗方法可作为未来听力损伤临床治疗的一部分应用于内耳损伤的治疗。目前主要有两个来源的干细胞可应用于治疗感音神经性耳聋: 内耳干细胞和胚胎干细胞。

### 1 内耳干细胞

干细胞已经从很多成人器官中分离并培养出来, 包括大脑、骨髓、肌肉、心脏、皮肤、眼以及内耳(图1)<sup>[1]</sup>。能分化出多种神经元性细胞类型

的神经干细胞, 已经被成功地植入药物损伤的小鼠内耳中。细胞成活了数周, 并表达包括神经胶质细胞、神经元和毛细胞等成熟细胞类型的标志, 但在耳蜗中均没有表达。成熟神经干细胞和成年小鼠内耳中干细胞的体外培养发现, 这两种细胞分化出毛细胞标志阳性细胞的能力有明显差别。首先, 内耳干细胞体外分化出的所有细胞中, 有毛细胞标记物上调的超过10%; 但分离自成人前脑的神经干细胞培养出的细胞中极少(<0.1%)为毛细胞标记物阳性。第二, 内耳干细胞比神经干细胞衍生物能更完全的分化出毛细胞, 通过形成特定静纤毛免疫标记阳性的纤毛束样结构可明显的观察到。将β半乳糖苷酶标记小鼠椭圆囊来源的细胞球植入E2.5(HH分级14-15)的鸡胚耳囊, 3d后, 可观察到植入细胞表达毛细胞标记物MyosinVIIA等<sup>[2]</sup>(图2)。

我们已成功在体外培养出成年小鼠内耳前体细胞, 这些前体细胞表达内耳发育过程中特征性表达

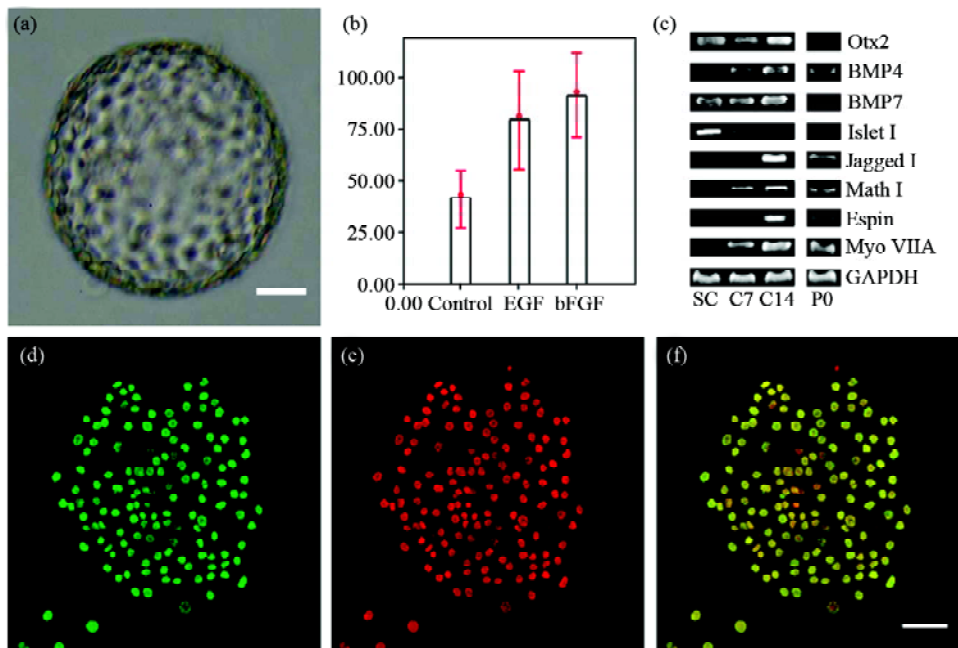


图1 新生小鼠耳蜗来源的细胞球及其特征

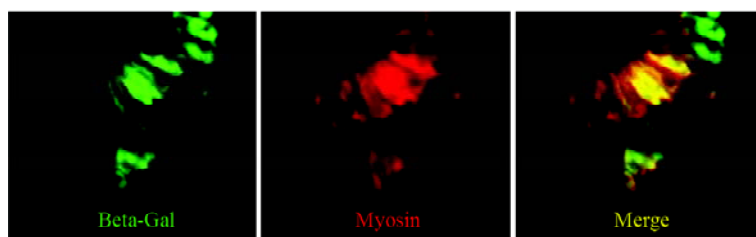


图2 表达β半乳糖苷酶的椭圆囊来源内耳前体细胞植入鸡听囊3d后毛细胞标记物上调

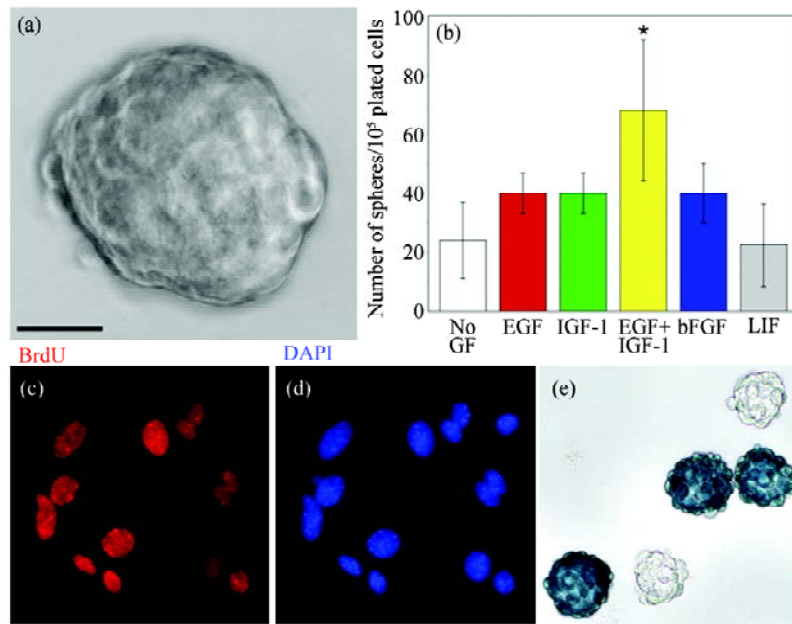


图3 小鼠椭圆囊单个增殖性细胞来源的细胞球

的一系列标志基因<sup>[2]</sup>(图3)。提取小鼠椭圆囊细胞,经低密度单细胞培养后,可形成细胞球,经体外分化后,胚胎干细胞来源的前体细胞的亚群可表现毛细胞表型,表达毛细胞特征性标志基因,如转录因子Math1 (murine atonal homologue 1)和对毛细胞的增殖和维持成熟很重要的Brn3.1,表达这些关键转录调节因子的同时存在有毛细胞结构蛋白的上调,包括MyosinVIIA、Parvalbumin3、F-actin和Espn。其周围细胞表达支持细胞标记物Pan-cytokeratin。体外分化14d后,MyosinVIIA阳性细胞占细胞总数 $8.7 \pm 3.8\%$ ,Espn阳性细胞占 $10.7 \pm 3.4\%$ ,几乎所有的MyosinVIIA或Espn阳性细胞均共表达Math1。 $6.4 \pm 2.6\%$ 表达神经细胞标记物, $35 \pm 7\%$ 表达神经胶质细胞标记物(图4)。

此外,内耳干细胞亦可向功能性感觉神经元分化,表达TuJ、GFAP等神经细胞标记。干细胞分化为感觉神经元后具有神经元的电生理特性。Corti器与前体细胞细胞球共培养后,可产生新的神经突触,达到神经再支配。

## 2 胚胎干细胞向内耳感觉细胞分化

体外培养的胚胎干细胞可依次向外胚层细胞、听觉基板细胞、感觉斑细胞、毛细胞分化。采用RT-PCR检测各分化阶段细胞标志性基因,显示胚胎干细胞、选择性前体细胞、已分化细胞分别表达早期标记物Nestin、Pax2、BMP7;过渡期标记物BMP7、Jagged-1、p27<sup>Kip1</sup>;毛细胞标记物Math1、Myosin VII A、Espn、Brn3.1、AchR $\alpha$ 9等(图5)<sup>[3]</sup>。

内耳前体细胞体外分化14d后,表达毛细胞标

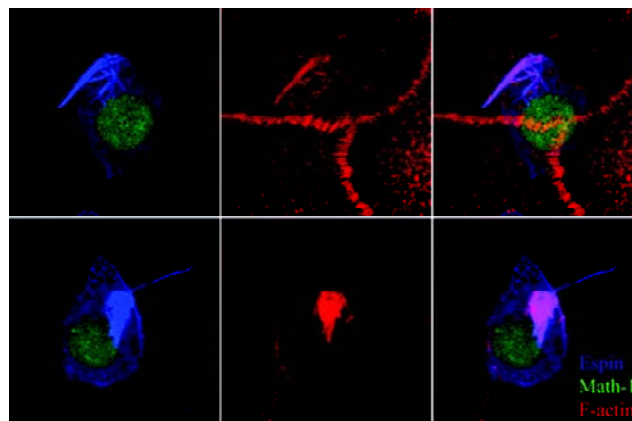


图4 内耳干细胞可分化为毛细胞

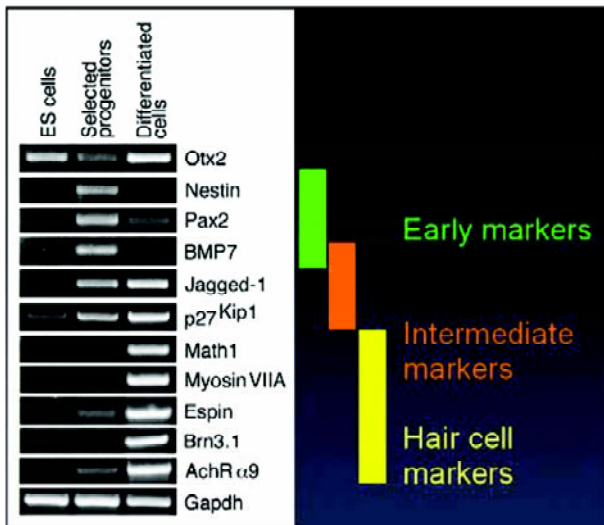


图5 RT-PCR检测胚胎干细胞向内耳感觉细胞分化各阶段表达的细胞标志性基因

记物 Math1、Myosin VII A、Espin、Parvalbumin3 等。已分化的细胞中 81 ± 14% Math1 阳性的细胞同时表达 Brn3.1, 83 ± 9% Math1 阳性细胞同时表达 MyosinVIIA。

我们将小鼠胚胎干细胞来源的内耳前体细胞标记后植入 E2.5 (HH 分级 14 - 15) 的鸡胚耳囊, 3d 后, 可观察到移植入发育中内耳感觉上皮的 β 半乳糖苷酶标记前体细胞可结合进入发育中的鸡听觉上皮, 并在合适的位置开始表达毛细胞标记物 Myosin VII A 和 F-actin (图6)。推测小鼠胚胎干细胞来源的内耳前体细胞植入发育中的鸡内耳后, 受到周围微环境中控制细胞分化类型因子的调控分化为毛细胞。虽然发育中的禽类内耳感觉上皮与损伤或病变的哺乳动物 corti 器或前庭感觉上皮有区别, 但这些结果是第一次成功的在体内从胚胎干细胞分化出毛细胞<sup>[3]</sup>。

已有研究证实将胚胎干细胞来源的神经前体细胞植入去神经支配的沙鼠耳蜗中后, 可分化出神经细胞并与毛细胞形成神经再支配。

### 3 激活人内耳干细胞治疗内耳疾病

成年小鼠内耳干细胞的发现使得通过刺激处于静止期的内耳干细胞增殖并生成新毛细胞重建受损内耳成为可能。激活内源性内耳干细胞或者诱导残存感觉上皮组织细胞分裂将会得到什么效果? 研究

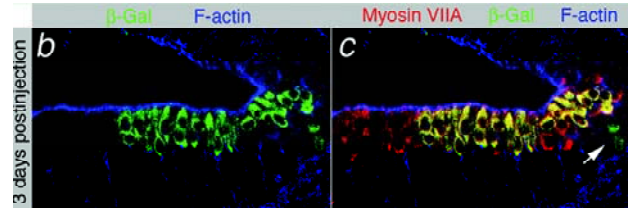


图6 移植的小鼠内耳前体细胞整合入鸡胚听觉上皮并分化为毛细胞

发现转染 *math1* 基因可以诱导内耳支持细胞转分化为毛细胞, 并使听觉功能部分恢复, 这项研究成果极大鼓舞了研究者探索新的治疗感音神经性耳聋的生物学技术, 如何激活静止内耳干细胞重建内耳感受器已经成为内耳再生医学的热点。

研究人类内源性内耳干细胞的应用首先要证实耳蜗中成体干细胞的存在, 有研究已从新生大鼠耳蜗中分离出了具有毛细胞分化潜能的成体干细胞, 但人耳蜗是否存在干细胞尚需要进一步研究。如果人耳蜗存在干细胞, 用于治疗内耳疾病尚需解决以下问题: (1) 哪些基因控制干细胞的自我更新与多向分化性? (2) 什么因素使内耳干细胞处于静止状态? (3) 怎样才能激活并调控干细胞向需要的细胞类型增殖分化<sup>[4]</sup>?

但是, 干细胞移植并不是治疗感音神经性耳聋的唯一途径, 未来的治疗可能是基因治疗、干细胞移植、药物治疗与电子耳蜗植入的联合疗法, 个性化的联合疗法为不同类型的感音神经性耳聋的听觉恢复提供了广阔的前景。

### [参 考 文 献]

- [1] Wang ZM, Jiang HQ, Yan YB, et al. Characterization of proliferating cells from newborn mouse cochleae. Neuroreport, 2006, 17(8): 767-71
- [2] Li HW, Liu H, Heller S, et al. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. Nat Med, 2003, 9(10): 1293-9
- [3] Li HW, Roblin G, Liu H, et al. Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. Proc of Natl Acad Sci USA, 2003, 100(23): 13495-500
- [4] Li HW, Corrales CE, Edge A, et al. Stem cells for therapy of hearing loss. Trends Mol Med, 2004, 10(7): 309-15