DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201306002

· 论著 ·

骨髓神经组织定向干细胞移植治疗大鼠听神经损伤的实验研究

张莹莹,梁耕田,刘　莉,卢　岭,刘金炎

(武汉市同仁医院 耳鼻咽喉科,湖北 武汉　430060)

摘　要:　目的　观察骨髓神经组织定向干细胞(nerve tissue committed stem cells, NTCSCs)移植治疗大鼠听神经损伤的作用。**方法**　将 60 只 SD 大鼠按数字随机法分为 5 组,每组各 12 只,A 组为对照组,在平静饲养环境下培养,另外 4 组(B、C、D、E 组)构建感音神经性耳聋动物模型。B 组大鼠断头后取出听泡组织行 HE 常规染色,详细观察耳蜗螺旋神经节神经元(spiral ganglion neurons, SGNs)损伤和内耳毛细胞存活情况,确认造模成功。将绿色荧光蛋白(green fluore scent protein, EGFP)基因表达阳性的骨髓 NTCSCs 注射至 C、D、E 3 组大鼠左耳耳蜗蜗轴处,SD 大鼠右耳及 A 组作为对照;采用同一方法注射相同体积的 0.1% PBS 溶液。HE 染色观察耳蜗中轴切片,在荧光显微镜下观察转染 EGFP 基因的 NTCSCS 存活、分布部位及表达情况。**结果**　C 组(移植后 1 周)内耳耳蜗切片上发现转染绿色荧光蛋白(green fluore scent protein, EGFP)基因的骨髓 NTCSCs 分散在鼓阶的腔隙内,D 组(移植后 2 周)发现转染 EGFP 基因的骨髓 NTCSCs 位置靠近基底膜和柯蒂氏器部位,E 组(移植后 4 周)发现转染 EGFP 基因的骨髓 NTCSCs 球团和多个在一起的细胞聚集,并且位置靠近基底膜和柯蒂氏器部位,呈现良好的分布,类似有向基底膜和柯蒂氏器迁移行为。随着骨髓 NTCSCs 移植时间的延长,Nestin(+)细胞数量明显增多($P<0.05$),而 Myosin Ⅶa(+)细胞数量无明显变化($P>0.05$)。**结论**　骨髓 NTCSCs 移植大鼠耳蜗后可在一定程度上修复损伤听神经。

关　键　词:神经组织定向干细胞;感音神经性耳聋;听神经病;螺旋神经节神经元

中图分类号:R764.4;Q81　**文献标识码:**A　**文章编号:**1007-1520(2013)06-0481-05

Experimental study of treatment of acoustic nerve injury in rats by bone marrow NTCSCs transplantation

ZHANG Ying-ying, LIANG Geng-tian, LIU Li, et al.

(*Department of Otolaryngology, Tongren Hospital of Wuhan City, Wuhan* 430060, *China*)

Abstract:　Objective　To observe the effect of bone marrow transplantation with nerve tissue committed stem cell (NTCSCs) on acoustic nerve injury in rats. **Methods**　60 rats were randomly divided into 5 groups equal in number. Group A was control group. Sensorineural deafness was induced in animals of Group B, C, D and E. Bone marrow NTCSCs transfected by green fluorescent protein (EGFP) gene were transplanted to left ear cochlea modiolus of rats in group C, D and E. The cochlear axis slice was observed under a fluorescence microscope after H-E staining. The survivorship, distribution site and expression of NTCSCs transfected with EGFP were observed. **Results**　In the slices of inner ear cochlea, the bone marrow NTCSCs transfected by green fluorescent protein (EGFP) gene were dispersed in the lacuma of the tympanic canal of cochlea in group C (one week after transplantation), in the basal membrane and Corti's organ in group D (two weeks after transplantation). In group E (four weeks after transplantation), aggregation of NTCSCs cluster with two or three cells was observed, and the location was close to basal membrane and Corti's organ with good distribution and tendency of migratory behaviour. With the time extension of bone marrow NTCSCs transplantation, Nestin (+) cells significantly increased ($P<$

作者简介:张莹莹,女,硕士,副主任医师。
通讯作者:张莹莹,Email:390434507@qq.com

0.05) while Myosin Ⅶa (+) showed no significant change in number of cells ($P > 0.05$). **Conclusions** Bone marrow NTCSCs transplanted to rat cochlea can gradually differentiate into spiral ganglion neurons, and therefore can repair acoustic nerve injury to some degree.

Key words: Nerve tissue stem cell; Sensorineural deafness; Auditory neuropathy; Spiral ganglion

感音神经性耳聋是一种对日常生活和学习均可造成严重影响的疾病,其主要是机体内耳毛细胞或耳蜗螺旋神经节神经元(spiral ganglion neurons, SGNs)发生变性和坏死现象所致[1-2]。目前临床上治疗此疾病的有效方法只有人工耳蜗植入[3],且对特殊的神经性耳聋—听神经病(auditory neuropathy, AN)难以取得理想的疗效[4]。由于人类内耳毛细胞和SGNs受到严重损伤后无法再生,进而导致永久性听力下降,故对受损内耳毛细胞和SGNs予以有效保护与修复是恢复听力的关键所在。近些年有较多研究认为,干细胞移植是治疗神经性耳聋的新方法[5-9],而骨髓神经组织定向干细胞(neural tissue-committed stem cells, NTCSCs)是来源于骨髓组织的成体干细胞,与其他类型干细胞比较,NTCSCs的分化潜力更为强大,且取材时不会破坏自身重要脏器和组织,也不会出现伦理和免疫排斥反应等方面的问题,是治疗神经性耳聋较为理想的干细胞来源,但目前尚无相关研究文献报道。因此本研究拟观察骨髓NTCSCs移植治疗听神经损伤实验大鼠的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

60只SD大鼠均购自华中科技大学附属同济医学院实验动物中心,清洁级,均为2月龄,重量平均为(150±20)g,雌雄不限;将60只SD大鼠按数字随机法分为5组,每组各12只,A组为对照组在平静饲养环境下培养,另外4组(B组,C组,D组、E组)构建感音神经性耳聋动物模型。B组大鼠断头后取出听泡组织行HE常规染色,详细观察SGNs损伤和内耳毛细胞存活情况,确认造模成功。将EGFP基因表达阳性的骨髓NTCSCs注射至C、D、E 3组大鼠左耳耳蜗蜗轴处,A组作为对照,采用同一方法注射相同体积的0.1% PBS溶液。

1.2 实验试剂

NycoPrepTM分离液(挪威, Axis-shield公司),DMEM/F12(1∶1)无血清培养液(中国,上海西唐生物科技有限公司),Lipofectamine 2000(美国,Invitrogen公司),Myosin Ⅶa、Nestin兔抗鼠单克隆荧光抗体(美国,Santa Cruz公司)。

1.3 骨髓NTCSCs处理

1.3.1 骨髓NTCSCs分离、培养及鉴定方法 无菌状态下取出大鼠股骨及胫骨组织,采用0.1% PBS溶液连续冲洗骨髓腔,然后使用NycoPrepTM分离液将骨髓单核细胞分离出来,无血清培养液制备成细胞悬液,按5×10^7/ml密度将细胞接种在六孔培养皿中,2 d后换新鲜培养液,吸弃未发生贴壁的细胞,将贴壁细胞接种在10 ml培养瓶中予以悬浮方式进行培养,经细胞免疫组化和免疫荧光方法检测示Nestin、CXCR4等蛋白表达阳性,确定为NTCSCs。

1.3.2 EGFP基因转染细胞 分别将pEGFP-C1和Lipofectamine 2000置入无血清培养液中混匀形成复合物,将混合液加入细胞培养板中孵育,然后在荧光显微镜下进行观察,计算EGFP基因转染率,加入新霉素予以G418筛选处理,克隆EGFP基因表达阳性的骨髓NTCSCs。

1.4 模型构建

SD大鼠全身麻醉后,解剖左侧耳后颅骨将圆窗龛完全暴露,缓慢注射100 μl浓度为1 mmol/L的毒毛旋花甙G,一直到圆窗龛完全填充满,1 h后将圆窗龛内毒毛旋花甙G清洗干净,最后彻底关闭术腔。术后与对照组在清洁和平静环境下饲养。

1.5 骨髓NTCSCs体内演变和听神经形态结构的变化

各组SD大鼠完成电生理测试后,迅速断头取出听泡组织,采用4%浓度的多聚甲醛溶液灌注入耳蜗内,固定处理2 d,石蜡包埋组织并制备组织切片,行HE常规染色,观察EGFP基因表达阳性的骨髓NTCSCs存活、分布及表达等具体情况。

1.6　Myosin Ⅶa、Nestin 荧光检测

采用免疫荧光染色方法检测组织切片中 Myosin Ⅶa、Nestin 表达情况,使用 10% 山羊血清封闭处理组织切片 30 min,然后分别加入 Nestin 单克隆荧光抗体(1∶1000)、Myosin Ⅶa 单克隆荧光抗体(1∶500),4℃ 温度条件下孵育反应 1 d,PBS 溶液漂洗 3 次,Nestin 加入 FITC(1∶100)绿光,Myosin Ⅶa 加入罗丹明(1∶200)红光,37℃ 温度条件下孵育反应 2 h,再次 PBS 溶液漂洗 3 次,荧光显微镜下观察并摄片,观察 5 个视野取平均值予以计数。

1.7　统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件对实验数据予以统计和分析,各组 Myosin Ⅶa(+)、Nestin(+)细胞数比较采用 t 检验,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　骨髓 NTCSCs 培养及鉴定

骨髓 NTCSCs 在培养液中可自然发生贴壁和分化等现象,分化后的细胞呈网状表现,继续培养 4~5 d 后可见悬浮桑葚状的细胞团形成。经胰酶溶液消化处理后可继续予以传代培养,经细胞免疫组化和免疫荧光方法检测可示 Nestin、CXCR4 等蛋白表达阳性,提示为具有自我更新能力的干细胞,见图 1。

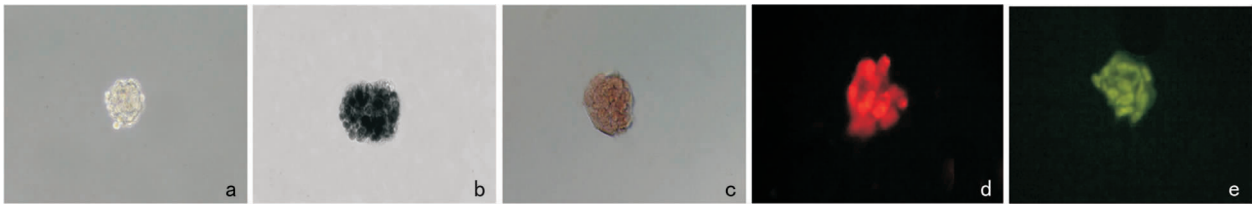

图 1　骨髓 NTCSCS 培养及鉴定　a:NTCSCs 细胞球(×100);b:NTCSCs 细胞球(Nestin 免疫组化 ×100);c:NTCSCs 细胞球(CXCR4 免疫组化 ×100);d:NTCSCs 细胞球(Nestin 免疫荧光 ×100);e:NTCSCs 细胞球(CXCR4 免疫荧光 ×100)

2.2　骨髓 NTCSCs 体内演变和听神经形态结构的变化

在荧光显微镜下观察转染 EGFP 基因的骨髓 NTCSCs 在大鼠内耳移植后行为,骨髓 NTCSCs 产生绿色荧光,其胞体为圆形或卵圆形。A 组大鼠内耳毛细胞生长正常,柯蒂氏器和基底膜,以及周围的盖膜、前庭膜、血管网和螺旋缘等结构较为清晰;B 组大鼠内耳毛细胞丢失或损伤死亡,表示感音神经性耳聋动物模型构建成功。移植后 1 周(C 组)大鼠内耳耳蜗切片上发现有转染 EGFP 基因的骨髓 NTCSCs,散在分布在鼓阶的腔隙内;移植后 2 周(D 组)发现转染 EGFP 基因的骨髓 NTCSCs,多位于基底膜和柯蒂氏器部位的附近;移植后 4 周(E 组)发现转染 EGFP 基因的骨髓 NTCSCs 球团和细胞聚集现象,逐渐接近基底膜和柯蒂氏器。具体见图 2。

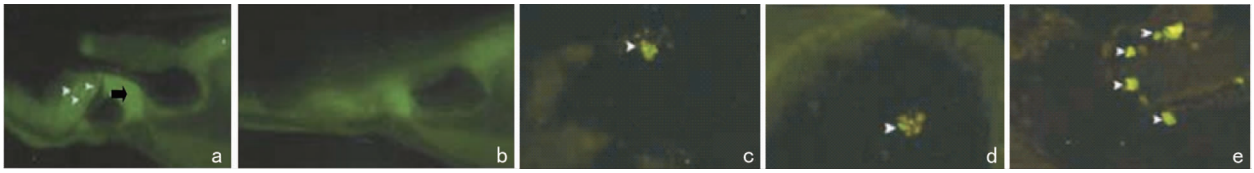

图 2　骨髓 NTCSCs 体内演变和听神经形态结构的变化(免疫荧光 ×100)　a:A 组白色箭头所指为外毛细胞,黑色箭头所指为内毛细胞;b:B 组药物损伤毛细胞后的耳蜗切片;c:C 组大鼠移植 1 周后;d:D 组大鼠移植 2 周后;e:E 组大鼠移植 4 周后

2.3　Myosin Ⅶa、Nestin 荧光检测结果

随着骨髓 NTCSCs 移植时间的延长,Nestin(+)细胞数量明显增多($P<0.05$),而 Myosin Ⅶa(+)细胞数量无明显变化($P>0.05$),见表 1 及图 3。

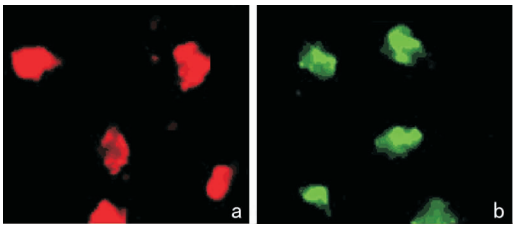

图 3　免疫荧光染色法检测组织切片中 Myosin Ⅶa、Nestin 的表达　a：Myosin Ⅶa（＋）荧光检测；b：Nestin（＋）荧光检测

表 1　Myosin Ⅶa、Nestin 荧光检测结果（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	Nestin（＋）细胞	Myosin Ⅶa（＋）细胞
C 组	12	279.1 ± 33.2	118.5 ± 25.6
D 组	12	445.8 ± 50.4 *	122.3 ± 31.3
E 组	12	657.2 ± 74.7 *#	139.1 ± 32.5

注：与 C 组比较，* $P < 0.05$；E 组与 D 组比较，# $P < 0.05$。

3　讨论

Nestin 是一种神经元前体的细胞表面抗原[10]，在神经板上皮阶段就会有一定表达，而当神经细胞生长发育及远处迁移运动结束后其表达水平逐渐下降，分化过程完成后则无任何表达。在成熟中枢神经细胞上 Nestin 基本无表达，故常作为神经干细胞鉴定的表面标记物[11]。肌浆球蛋白Ⅶa（Myosin Ⅶa）是一种肌浆球蛋白基因，主要定位于耳蜗及前庭毛细胞静纤毛和表皮板。Myosin Ⅶa 在构建 Corti’s 器静纤毛组织结构中起着重要的作用，其发生异常突变可使得纤毛出现各种错位现象，进而难以正常维持纤毛束张力、运动及传导通道的作用，最终导致耳聋发生[12]。

本实验发现体外分离和培养的骨髓 NTCSCs Nestin 表达呈阳性，提示其具有神经干细胞的特征性表现。将骨髓 NTCSCs 移植至大鼠耳蜗处，初始其主要散在分布于鼓阶的腔隙内；移植后 2 周骨髓 NTCSCs 接近于基底膜和柯蒂氏器部位；随着移植时间的延长，骨髓 NTCSCs 球团和细胞发生聚集现象，逐渐接近基底膜和柯蒂氏器，此结果说明骨髓 NTCSCs 在大鼠耳蜗内可逐步发生分化。研究还发现组织切片中 Nestin（＋）细胞数量明显增多（$P < 0.05$），而 Myosin Ⅶa（＋）细胞数量无明显变化（$P > 0.05$），提示骨髓 NTCSCs 仅有转化成为 SGNs 的潜力。内耳细胞尤其是毛细胞及相关的神经元损伤丢失可导致听觉损伤和平衡觉失调。

由此可知，将 NTCSCs 植入内耳大部分能存活，且部分 NTCSCs 可分化成毛细胞和螺旋神经节的祖细胞，与国外相关研究相符合[13-14]。而且，有研究证实干细胞植入对于暂时缺血导致的毛细胞损伤有预防作用[15]。本研究结果也证实骨髓 NTCSCs 移植大鼠耳蜗后可起到修复损伤听神经的作用。虽然干细胞在耳聋治疗中的研究刚刚开始，再生的毛细胞为不成熟毛细胞，只是表达毛细胞特异性的细胞表型，距离成熟的毛细胞形态和功能还有很大的差距，但干细胞在耳聋治疗中的研究成果为内耳细胞损伤后再生带来了希望。

参考文献：

[1] 刘寒波，彭增龙，胡建平，等. 急性低频感音神经性耳聋的临床观察[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志，2012，18(4)：289－291.

[2] 王亮亮，刘强和. 骨髓基质干细胞移植与老年性耳聋的相关性研究[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志，2013，19(1)：89－92.

[3] 杨海弟，郑亿庆，陈涛，等. 晚期梅尼埃病人工耳蜗植入研究并文献复习[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志，2012，18(6)：455－459.

[4] Ibnubaidah MA, Chua KH, Mazita A, et al. Derivation of cochlea hair cell for in vitro expansion and characterization [J]. Med J Malaysia, 2008, 63 Suppl A: 115－116.

[5] 陈净华，黄建民，林国经. 干细胞在感音神经性耳聋治疗中的研究[J]. 医学综述，2007，13(11)：819－820.

[6] 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.

[7] Tateya I, Nakagawa T, Iguchi F, et al. Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice [J]. Neuroreport, 2003, 14(13): 1677－1681.

[8] Ito J. Regeneration of the auditory pathway [J]. Nippon Rinsho, 2003, 61(3): 469－474.

[9] Kojima K, Tamura S, Nishida TA, et al. Generation of inner ear hair cell immunophenotypes from neurospheres obtained from fetal rat central nervous system in vitro [J]. Acta Otolaryngol Suppl, 2004, (551): 26－30.

[10] Shigeo O, Karin FN, Spiro AC, et al. Development of neuronal precusor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro [J]. Medchanisms of Development, 1996, 59(1): 89－97.

[11] Lendahl U, Zimmerman LB, Mckay RD. CNS stem cells

（下转第 490 页）