

## 脐血间充质干细胞治疗感音神经性听力下降的研究进展

孙夏雨<sup>1</sup> 杨军<sup>1</sup>

[关键词] 听觉丧失,感音神经性;脐血间充质干细胞;治疗结果

doi:10.13201/j.issn.2096-7993.2020.12.023

[中图分类号] R764.43 [文献标志码] A

### Research advances on umbilical cord blood derived mesenchymal stem cell in therapy of sensorineural hearing loss

**Summary** Sensorineural hearing loss(SNHL) is a difficult and hot issue in the field of otology. The effect of medications targeting the mechanism of SNHL are often unsatisfactory for hearing improvement. Hearing aids and cochlear implants are the mainstream treatment methods at present, but neither of them can reverse the pathological changes of affected inner ear. In recent years, mesenchymal stem cells transplantation has been confirmed by several animal studies and clinical trials to have great potential for clinical applications in restoring the structure of the inner ear and hearing improvement to some extent. In this review, we review the characteristics of umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells(UCBMSCs), the approaches of transplantation, the efficacy and mechanism of UCBMSCs in the treatment of SNHL, and the safety of clinical application, covering the existing problems and future prospects of this rising treatment.

**Key words** hearing loss, sensorineural; umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells; treatment outcome

因耳蜗、听神经或听觉中枢病变引起的感音神经性听力下降(sensorineural hearing loss, SNHL)是人类最常见的感觉功能障碍性疾病<sup>[1]</sup>,根据病因可分为遗传性、获得性和特发性。超过 60% 的先天性或早发性 SNHL 有遗传因素<sup>[2]</sup>,另约 35% 有明确的获得性病因,如宫内感染、环境因素暴露、脑膜炎、应用耳毒性药物、母孕期药物应用史或饮酒史、早产、出生时低 Apgar 评分等<sup>[3]</sup>。现在普遍认为 SNHL 发生后不可逆转,听力水平可能会逐渐从轻度聋进展至重度或极重度聋<sup>[4]</sup>。因为哺乳动物成熟的毛细胞、支持细胞和螺旋神经元不具有自发的再生能力<sup>[5]</sup>,自我修复能力有限,这意味着预防及治疗 SNHL 的关键在于如何保证这些细胞的数量和功能。

目前 SNHL 最常见的治疗方式是佩戴助听器和植入人工耳蜗,均补充受损的 Corti 器功能而非逆转其潜在病理改变<sup>[6]</sup>。其中人工耳蜗植入是重度和极重度聋患者重建听力的主要选择,但预后仍不确定,即使是预后最好的患者,也无法恢复正常听力<sup>[4]</sup>。部分由梅尼埃病、噪声暴露、自身免疫、应用耳毒性药物导致的 SNHL 及突发性特发性 SNHL 可通过全身或内耳局部用药改善部分听力,但由于内耳有限的血供及血迷路屏障的存在,全身

大剂量给药易导致不良反应,内耳局部用药则有医源性损伤的风险<sup>[7]</sup>。

对于基因突变导致的遗传性 SNHL,应用腺相关病毒作为基因片段载体替代靶向基因、应用反义寡核苷酸或核糖核酸干扰技术抑制靶向基因、应用 CRISPR/Cas9 敲除靶向基因的特异性基因疗法在小鼠中获得成功,但在进入临床试验前仍面临一系列挑战<sup>[8-9]</sup>。另外,内源性促进毛细胞再生的治疗方法不断得到突破,通过调控转录因子 Atoh1 促进支持细胞向毛细胞分化、敲除细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 p27<sup>kip1</sup> 基因促进毛细胞增殖以及通过调控 Notch 信号通路下游转录因子 Hes1 和 Hes5 增加毛细胞数量等方法在小鼠中取得进展<sup>[10-11]</sup>。

近年来移植具有多向分化能力的干细胞如胚胎干细胞、成体干细胞、诱导多能干细胞修复受损内耳的技术在多项动物实验中取得显著进展<sup>[12]</sup>。最新的临床前期研究中,移植自体骨髓和脐血来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)治疗 SNHL 的临床安全性得到证实,其中经静脉注射脐血 MSCs 对改善听力疗效确切<sup>[6,13]</sup>。因此本文从脐血 MSCs 的特点、移植途径、治疗 SNHL 的疗效及机制、临床应用安全性、问题与展望几个方面进行综述。

#### 1 脐血 MSCs 的特点

MSCs 是一种成体干细胞,存在于骨髓、脂肪、胎盘、脐带血等多种组织中,可以自我更新,也能分化出多种特定的细胞类型,被广泛应用于细胞治疗

<sup>1</sup>上海交通大学医学院附属新华医院耳鼻咽喉头颈外科  
上海交通大学医学院耳科学研究所 上海市耳鼻疾病转化医学重点实验室(上海,200092)  
通信作者:杨军, E-mail: yangjun@xinhamed.com.cn

领域<sup>[14-15]</sup>。目前应用最广泛的是骨髓和脂肪来源的 MSCs,大量临床研究已经证实其临床应用的安全性,但存在取材有创易致创口感染、干细胞数量及增殖分化能力受供体特性影响大等问题<sup>[16]</sup>。

脐血来源的 MSCs 在出生时采集,最大的优点是获取容易且对供体无创,并能避免一系列伦理冲突;其次,脐血 MSCs 成熟度低,不会在异基因受体中引起强烈的免疫排斥反应;另外,脐血 MSCs 的细胞数量丰富,扩增和移植能力强,体外培养的平均倍增时间为 30 h。但脐血 MSCs 在分化出特定的细胞类型,如脂肪细胞和骨细胞方面不如脂肪和骨髓来源的 MSCs;此外,产科因素如孕周、生产方式、母亲生育年龄、妊娠期并发症(如妊娠期糖尿病、子痫前期)等均会影响脐血 MSCs 的增殖分化能力<sup>[16]</sup>。

在其他学科的临床研究中,手术直接移植脐血 MSCs 可成功治疗多种骨关节疾病<sup>[17-18]</sup>,静脉输注脐血 MSCs 不仅成功应用于治疗移植抗宿主病和系统性红斑狼疮<sup>[16]</sup>,还能改善脑瘫<sup>[19]</sup>、严重脓毒血症<sup>[20]</sup>和类风湿关节炎<sup>[21]</sup>等疾病的症状,且无明显不良反应。然而到目前为止,美国食品药品监督管理局仅批准骨髓来源的 MSCs 用于临床治疗,脐血 MSCs 仍缺乏足够的临床研究以证实其安全性和有效性。

## 2 应用脐血 MSCs 治疗 SNHL 的移植途径

移植干细胞治疗 SNHL 的最终目的是将干细胞引入内耳受损区域,同时尽量减少因移植造成的额外损伤。经外科手术移植主要有 3 种方法,其中经鼓阶移植最常用,最大的优点是鼓阶较耳蜗其他结构可操作空间大,可在圆窗附近或直接通过圆窗行耳蜗造口,造成的医源性损伤较小,而且在灌流系统的辅助下,外淋巴液循环可使移植细胞分布至耳蜗的不同区域,包括 Corti 器、蜗螺旋管和螺旋韧带等,并分化成毛细胞、支持细胞和螺旋神经元等多种细胞<sup>[22]</sup>。

以直接修复受损 Corti 器为目的,可经中阶植入 MSCs,但需克服几大生物学屏障。首先中阶内淋巴液中的高浓度钾离子(约 150 mmol/L)对多种细胞有毒性作用,移植 MSCs 的生存能力有限;另外 Corti 器细胞结构复杂,移植 MSCs 难以突破毛细胞和支持细胞之间的紧密连接屏障进行迁移和归巢。动物实验显示 MSCs 移植入中阶后不能分化、整合入受体组织,移植操作还会损害耳蜗结构,破坏中阶离子环境和内淋巴液电位,损伤血管纹影响耳蜗血供,因此技术难度较大<sup>[22]</sup>。

以直接替换变性螺旋神经元为目的,可经耳蜗轴移植干细胞。得益于适宜的蜗轴微环境,此法 MSCs 存活率最高,且成功分化出神经元和神经胶质细胞的表面标记,能在移植部位形成异位神经

节,并向蜗螺旋管和 Corti 器投射轴突。但干细胞几乎不能迁移入蜗螺旋管,而且移植操作也无法避免会在一定程度上破坏耳蜗的结构和功能<sup>[22]</sup>。

静脉输注 MSCs 能有效避免耳蜗的医源性损伤,MSCs 可经血液循环至耳蜗,但 Choi 等<sup>[23]</sup>发现它们仅分布在耳蜗的螺旋神经节区域,这可能与蜗轴、螺旋神经节、骨螺旋板处的毛细血管为有孔毛细血管而血管纹处为连续毛细血管有关,因此 MSCs 难以通过血管纹进入 Corti 器。Choi 等<sup>[24]</sup>观察到 MSCs 可迁移至 Corti 器的底转至顶转附近,但未说明最终是否进入 Corti 器。Bettini 等<sup>[25]</sup>认为移植 MSCs 在增殖分化过程中会与受体细胞融合形成杂交细胞,而受体 Corti 器中几乎没有此种杂交细胞,说明 MSCs 可能并不直接在 Corti 器局部发挥修复作用。

## 3 应用脐血 MSCs 治疗 SNHL 的疗效

Choi 等<sup>[24]</sup>首先在 SNHL 豚鼠中静脉应用人脐血 MSCs,观察到螺旋神经元的形态得到改善,数量增加,在耳蜗各区域排列正常,个别豚鼠还出现耳蜗中部及底部毛细胞的再生。5 周后听觉脑干诱发电位(auditory brainstem response, ABR)阈值得到改善,从 80~90 dB 降至 40 dB,用于评价耳蜗外毛细胞功能的畸变产物耳声发射结果升高至接近正常值,提示治疗组内耳听力得到改善。

在自体脐血 MSCs 静脉输注治疗儿童获得性 SNHL 的 I 期临床试验中<sup>[6]</sup>,11 例 6 个月~6 岁的患儿移植不同数量的 MSCs,有 5 例移植细胞数量大于  $15 \times 10^6$  总有核细胞数(TNC)/kg 的患儿 1 个月后 ABR 阈值降低  $>5$  dB,其中 4 例伴有听神经 V 波传导潜伏期缩短  $>0.5$  ms,这可能意味着毛细胞、Corti 器和螺旋神经节得到一定程度的修复;另外,3 例 ABR 阈值改善的患儿颞横回白质的平均各项异性分数(fractional anisotropy)值有所增加,提示脐血 MSCs 移植可逐渐促进白质髓鞘化,恢复听觉传导通路的完整性。后期配合助听器佩戴及适当的言语-语言治疗,患儿语言发展水平可接近同龄儿童。

尽管动物实验和临床前期试验均发现静脉应用脐血 MSCs 治疗 SNHL 有确切的疗效,能在一定程度修复内耳结构和改善听觉功能,可以作为干细胞治疗的细胞来源,但目前为止仍缺乏足够的研究数据,尤其是使用安慰剂的大样本随机双盲对照试验,以进一步证实其有效性及持续性。

## 4 脐血 MSCs 治疗 SNHL 的机制

移植 MSCs 在受损耳蜗组织的趋化下被招募至耳蜗不同区域,在局部微环境的作用下通过细胞间直接接触诱导受体内耳中的干细胞分化产生新生毛细胞和螺旋神经元<sup>[26]</sup>。同时 MSCs 也可分泌多种促生长因子和抗凋亡因子,如转化生长因

子 $\beta$ 、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)等,通过旁分泌作用于局部干细胞促进其增殖分化产生新生细胞,作用于残余螺旋神经元和毛细胞促进其存活、改善其结构并发挥生理功能<sup>[25,27-28]</sup>。经静脉输注的MSCs亦可调节循环中的巨噬细胞表型和细胞因子,通过免疫调节作用和系统旁分泌作用诱导受体耳蜗内干细胞分化为新生毛细胞和螺旋神经元<sup>[26]</sup>。此外,MSCs还可在局部与受体细胞融合形成杂合细胞发挥旁分泌的作用<sup>[25]</sup>。

另一方面,受损微环境释放GDNF、BDNF等因子促进移植MSCs分化产生修复所需的细胞类型<sup>[29]</sup>,如分化为螺旋神经元直接替换受损细胞<sup>[30]</sup>,分化为接合素-26阳性的II型和V型成纤维样细胞辅助受损内耳重建<sup>[31]</sup>。MSCs与受体细胞融合形成的杂合细胞也可在受损微环境作用下进行基因重组,定向分化产生修复所需的细胞谱系<sup>[25]</sup>。

## 5 静脉输注脐血MSCs的安全性

静脉应用自体脐血MSCs<sup>[6]</sup>、异基因脐血MSCs的多项I期临床试验中<sup>[20-21]</sup>,最高单剂量为 $1 \times 10^8$  TNC/kg注射时并没有注射相关不良反应,随访1年余也无肝肾功能变化等全身不良反应。Huang等<sup>[19]</sup>连续4周定量注射1剂 $5 \times 10^7$  TNC/kg的异基因脐血MSCs,移植后2年未出现严重全身不良反应,也未观察到急性免疫排斥和致瘤性等特异性不良反应,仅有少数患者出现轻度上呼吸道感染及腹泻。另有病例报告<sup>[32]</sup>使用同样的分次注射方法,连续4周定量注射1剂 $5 \times 10^7$  TNC/kg的异基因脐血MSCs为1周期,2年内每半年完成1周期的注射治疗,随访5年未观察到肿瘤形成等全身不良反应。目前已有的临床实验均证实静脉输注脐血MSCs是一种可行且安全的治疗方式,但样本量均较小,未来需要在样本规模更大的临床研究中进一步确定安全及有效剂量并观察长期不良反应。

## 6 问题与展望

脐血MSCs在治疗各种需要受损细胞和组织再生的疾病中具有巨大潜力,在SNHL中的应用也初见成效,但目前为止仍面临许多问题。①如何保证不同移植途径进入体内的MSCs被招募迁移至理想的位置,如Corti器。目前认为静脉输注的干细胞难以通过血管纹的血迷路屏障进入Corti器<sup>[23-25]</sup>,多种外科移植方式也难以使干细胞迁移至Corti器,且易对耳蜗造成损伤,因此,如何克服这些困难是下一步试验需要关注的。②如何提高移植MSCs在体内的存活率。现有的研究认为耳蜗内淋巴液中高浓度的钾离子不利于干细胞存活,

MSCs仅在蜗轴的微环境中具有较高的生存率<sup>[22]</sup>,这大大限制了MSCs的定居位置,不利于其发挥修复再生作用。③如何提高移植MSCs在体内分化出修复所需细胞的效率。动物实验发现即使在蜗轴,移植后1周也仅有2.3%的MSCs表达出螺旋神经元标志性的谷氨酸标记物<sup>[12]</sup>,直接替换受损螺旋神经元的作用有限。④目前认为移植MSCs在难以进入Corti器的情况下,主要通过旁分泌多种细胞因子促毛细胞和支持细胞再生<sup>[25,27-28]</sup>,但具体的作用机制仍不明确,需要进一步研究。⑤招募至受损局部的MSCs只占移植总量的一部分,因此需要确定移植干细胞的有效剂量,但在提高注射剂量的同时也需要关注临床应用的安全性,未来仍需进一步确定MSCs治疗SNHL的剂量效应曲线。⑥目前的研究中移植MSCs并不能完全恢复SNHL患者的听力,仅能部分改善,因此可能需要后续配合使用助听器及药物治疗<sup>[6]</sup>。⑦现有的临床试验样本量均较小、随访时限较短,尽管尚未发现明显的不良反应和并发症,但仍需警惕可能存在的长期不良反应。未来仍需更多的多中心大样本随机双盲对照试验,进一步探究其安全性。

## 参考文献

- [1] Wilson DH, Walsh PG, Sanchez L, et al. The epidemiology of hearing impairment in an Australian adult population[J]. *Int J Epidemiol*, 1999, 28(2): 247-252.
- [2] Cabanillas R, Dineiro M, Cifuentes GA, et al. Comprehensive genomic diagnosis of non-syndromic and syndromic hereditary hearing loss in Spanish patients[J]. *BMC Med Genomics*, 2018, 11(1): 58.
- [3] Mafong DD, Shin EJ, Lalwani AK. Use of laboratory evaluation and radiologic imaging in the diagnostic evaluation of children with sensorineural hearing loss[J]. *Laryngoscope*, 2002, 112(1): 1-7.
- [4] Okano T, Kelley MW. Stem cell therapy for the inner ear: recent advances and future directions[J]. *Trends Amplif*, 2012, 16(1): 4-18.
- [5] Wong AC, Ryan AF. Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in the cochlea[J]. *Front Aging Neurosci*, 2015, 7: 58.
- [6] Baumgartner LS, Moore E, Shook D, et al. Safety of Autologous Umbilical Cord Blood Therapy for Acquired Sensorineural Hearing Loss in Children[J]. *J Audiol Otol*, 2018, 22(4): 209-222.
- [7] Mittal R, Pena SA, Zhu A, et al. Nanoparticle-based drug delivery in the inner ear: current challenges, limitations and opportunities[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 1312-1320.
- [8] Zhang W, Kim SM, Wang W, et al. Cochlear Gene Therapy for Sensorineural Hearing Loss: Current Status and Major Remaining Hurdles for Translational Success[J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 221.

- [9] Omichi R, Shibata SB, Morton CC, et al. Gene therapy for hearing loss[J]. *Hum Mol Genet*, 2019, 28(R1): R65-R79.
- [10] Chen Y, Zhang S, Chai R, et al. Hair Cell Regeneration[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1130: 1-16.
- [11] Shu Y, Li W, Huang M, et al. Renewed proliferation in adult mouse cochlea and regeneration of hair cells[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5530.
- [12] Dufner-Almeida LG, Cruz D, Mingroni Netto RC, et al. Stem-cell therapy for hearing loss: are we there yet? [J]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2019, 85(4): 520-529.
- [13] Lee HS, Kim WJ, Gong JS, et al. Clinical Safety and Efficacy of Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Sensorineural Hearing Loss Patients[J]. *J Audiol Otol*, 2018, 22(2): 105-109.
- [14] Karamini A, Bakopoulou A, Andreadis D, et al. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Stem Cells in Rheumatoid Arthritis: a Systematic Review of In Vivo Studies[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2020, 16(2): 276-287.
- [15] Lelek J, Zuba-Surma EK. Perspectives for Future Use of Extracellular Vesicles from Umbilical Cord-and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Therapies-Synthetic Review[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): E799.
- [16] Berebichez-Fridman R, Montero-Olvera PR. Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review[J]. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 2018, 18(3): e264-e277.
- [17] Park YB, Ha CW, Lee CH, et al. Cartilage Regeneration in Osteoarthritic Patients by a Composite of Allogeneic Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronate Hydrogel: Results from a Clinical Trial for Safety and Proof-of-Concept with 7 Years of Extended Follow-Up[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(2): 613-621.
- [18] Song JS, Hong KT, Kim NM, et al. Allogenic umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells implantation for the treatment of juvenile osteochondritis dissecans of the knee[J]. *J Clin Orthop Trauma*, 2019, 10(Suppl 1): S20-S25.
- [19] Huang L, Zhang C, Gu J, et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cell Infusion for Children With Cerebral Palsy[J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(2): 325-334.
- [20] He X, Ai S, Guo W, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem(stromal) cells for treatment of severe sepsis: a phase 1 clinical trial[J]. *Transl Res*, 2018, 199: 52-61.
- [21] Park EH, Lim HS, Lee S, et al. Intravenous Infusion of Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Rheumatoid Arthritis: A Phase Ia Clinical Trial[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(9): 636-642.
- [22] Qiu Y, Qiu J. Stem Cells: A New Hope for Hearing Loss Therapy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1130: 165-180.
- [23] Choi BY, Song JJ, Chang SO, et al. Intravenous administration of human mesenchymal stem cells after noise-or drug-induced hearing loss in rats[J]. *Acta Otolaryngol*, 2012, 132 Suppl 1: S94-102.
- [24] Choi MY, Yeo SW, Park KH. Hearing restoration in a deaf animal model with intravenous transplantation of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 427(3): 629-636.
- [25] Bettini S, Franceschini V, Astolfi L, et al. Human mesenchymal stromal cell therapy for damaged cochlea repair in nod-scid mice deafened with kanamycin[J]. *Cytotherapy*, 2018, 20(2): 189-203.
- [26] Xu YP, Shan XD, Liu YY, et al. Olfactory epithelium neural stem cell implantation restores noise-induced hearing loss in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2016, 616: 19-25.
- [27] Chen HC, Liang CM, Wang CH, et al. Transplantation of human limbus-derived mesenchymal stromal cells via occipital approach improves hearing in animal auditory neuropathy[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2019, 117: 67-72.
- [28] Yoo TJ, Du X, Zhou B. The paracrine effect of mesenchymal human stem cells restored hearing in  $\beta$ -tubulin induced autoimmune sensorineural hearing loss[J]. *Hear Res*, 2015, 330(Pt A): 57-61.
- [29] Jang S, Cho HH, Kim SH, et al. Neural-induced human mesenchymal stem cells promote cochlear cell regeneration in deaf Guinea pigs[J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2015, 8(2): 83-91.
- [30] Cho YB, Cho HH, Jang S, et al. Transplantation of neural differentiated human mesenchymal stem cells into the cochlea of an auditory-neuropathy guinea pig model[J]. *J Korean Med Sci*, 2011, 26(4): 492-498.
- [31] Kasagi H, Kuhara T, Okada H, et al. Mesenchymal stem cell transplantation to the mouse cochlea as a treatment for childhood sensorineural hearing loss[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2013, 77(6): 936-942.
- [32] Zhang C, Huang L, Gu J, et al. Therapy for Cerebral Palsy by Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells Transplantation Combined With Basic Rehabilitation Treatment: A Case Report[J]. *Glob Pediatr Health*, 2015, 2: 2333794X15574091.

(收稿日期: 2019-12-02)