论著

文章编号:1000-5404(2008)10-0906-04

BMP-7基因修饰的骨髓间充质干细胞在小鼠肾脏内的表达

卫 静,袁发焕,周剑峰,侯卫平,李芙蓉,黄云剑 (第三军医大学新桥医院肾内科,全军肾脏病中心,重庆市肾病研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 构建BMP-7基因腺相关病毒,转染骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs),移植入小鼠体内,观察其在肾脏的定植情况。**方法** 采用分子克隆技术,构建重组质粒pAAV-BMP-7。采用磷酸钙沉淀法,重组质粒与pAAV-RC、pHelper共转染HEK-293细胞,产生具有传染性的病毒颗粒。将此病毒颗粒转染BMSCs后,经尾静脉注射入小鼠体内,免疫组化方法检测其在肾脏的定植情况。**结果** 成功构建了BMP-7基因腺相关病毒,可以高效转染BMSCs,移植入小鼠体内后,该细胞可在肾脏内定植。**结论** BMSCs能稳定、高效表达外源基因BMP-7,并可在肾脏内定植。

关键词: BMP-7;腺相关病毒;骨髓间充质干细胞;移植

中图法分类号: R322.61;R329.2;R394.2 **文献标识码:** A

Expression of BMP-7 gene modified bone marrow mesenchymal stem cells in the kidneys of mice

WEI Jing, YUAN Fa-huan, ZHOU Jian-feng, HOU Wei-ping, LI Fu-rong, HUANG Yun-jian (Renal Diseases Research Center, Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of BMP-7 gene modified bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) after mice were exposed to ^{60}Co gamma ray. Methods The recombinant adeno-associated virus vectors encoding BMP-7 (pAAV-BMP-7) were constructed with the technique of molecular cloning. The recombinant expression plasmid were co-transfected into HEK-293 cells with pHelper and pAAV-RC by calcium-phosphate precipitation method. Recombinant AAV viral particles from infected HEK-293 cells were used to infect BMSCs. The infected MMSCs were injected into mice through caudal vein after the BALB/c mice were exposed to 8.0 Gy ^{60}Co γ ray. BMP-7 expressions were observed by immunocytochemical staining in the kidneys of control mice only exposed to γ ray and mice transfected with BMSCs or BMP-7 gene modified BMSCs. Results The recombinant AAV vectors of BMP-7 gene were constructed and expressed in BMSCs successfully. The infected BMSCs could lodge in the kidneys. Conclusion These genetically modified BMSCs might be used for further research on gene therapy of renal diseases.

Key words: BMP-7; adeno-associated virus; bone marrow mesenchymal stem cell; transplantation

骨形态发生蛋白-7(bone morphogenetic protein-7, BMP-7)是TGF-β超家族成员之一,在肾脏胚胎的发生和维持肾脏正常的组织结构和生理功能方面起着重要的作用。它也能促进肾损伤的修复,抑制炎症和细胞凋亡,阻止肾脏纤维化[1,2]。研究表明将BMP-7基因移植入肾脏损伤模型后,肾小管上皮细胞坏死及肾脏纤维化程度明显减轻,肾脏功能得以恢复[3]。

基因治疗是肾脏病治疗的一个研究方向,进行基因治疗需要有效的载体和运载细胞。目前腺相关病毒载体(adeno-associated virus, AAV)和骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是公认的基因治疗中有希望的载体和运载细胞。腺相关病毒能定点整合在宿主细胞的19号染色体上,使得所携带的目的基因可以在宿主细胞内长期表达。BMSCs因其具有易获得、低免疫原性、能在宿主体内长期存

基金项目:国家自然科学基金(30570871);重庆市科委自然科学基金(2007BB5017)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570871) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5017)

作者简介:卫 静,女,山西省晋城市人,博士研究生,主治医师,主要从事肾脏病细胞治疗方面的研究。电话:(023)68774068, E-mail: weijing1977@21cn.com

通信作者:黄云剑,电话:(023)68774068

收稿日期:2007-10-25;修回日期:2007-11-18

活,并且在体内参与受损组织的重建等特点,故是理想的运载细胞。为此,我们将携带 BMP-7 基因的重组 AAV 感染小鼠 BMSCs,并将其移植入小鼠体内,观察其在肾脏内的定植情况,为肾脏疾病的治疗提供实验基础。

1　材料与方法

1.1　材料

AAV Helper-Free System (pAAV-MCS vector、pAAV-GFP vector、pAAV-RC plasmid、pHelper plasmid)、HEK-293 细胞和 XL10-Gold 感受态细胞购自 Stratagene 公司,*E. coli* DH5α 及含全长 BMP-7 基因表达质粒为本实验室保存,限制性核酸内切酶 *Hind*Ⅲ、*Sal* Ⅰ及 T_4 DNA 连接酶,购自 TaKaRa 公司,超纯质粒小量抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自 Omega 公司,葡萄球菌肠毒素购自军事医学科学院,DMEM/F12 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司,胰蛋白酶、β 磷酸甘油钠、维生素 C 购自 Sigma 公司,anti-mouse CD45、anti-mouse CD90 购自 Biolegend 公司,anti-mouse CD34、anti-mouse CD44 购自 AbD Serotec 公司。

4 ~ 6 周龄 BALB/c 小鼠 60 只,体质量 18 ~ 20 g,雌雄不限,购自本校实验动物中心。

1.2　方法

1.2.1　携带 BMP-7 基因的重组 AAV 载体的构建　　将 pAAV-MCS 转入 XL10-Gold 感受态细胞,含 BMP-7 基因的质粒经电穿孔法转导入 *E. coli* DH5α,分别接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 ℃剧烈振荡过夜培养。按超纯质粒小量抽提试剂盒说明书抽提质粒,用 *Hind*Ⅲ/*Sal* Ⅰ双酶切消化,经琼脂糖凝胶电泳回收 4.7 kb 的载体片段和 1.5 kb 的 BMP-7 cDNA 片段。将纯化后的片段等物质的量混合,加入 T_4 DNA 连接酶,16 ℃ 反应 4 h。将连接产物转入 XL10-Gold 感受态细胞,在含氨苄青霉素的 LB 培养基中扩增,抽提质粒,得到 pAAV-BMP-7 重组质粒,经 *Hind*Ⅲ/*Sal* Ⅰ双酶切鉴定。

1.2.2　rAAV-BMP-7 的制备　　接种 HEK-293 细胞 3×10^6 于直径 10 cm 培养皿中。实验组吸取每个质粒溶液 pAAV-BMP-7、pAAV-RC、pHelper(浓度为 1 μg/μl)各 10 μl 加入离心管中,再加入 1 ml 0.3 mol/L $CaCl_2$, 轻混匀。加入 2 × HBS 1 ml 于另一离心管中,滴加上述 1.03 ml DNA/$CaCl_2$ 混合物,重复吹打混匀。滴加方式加入 DNA/$CaCl_2$/HBS 悬液于 HEK-293 细胞培养皿中,旋转均匀分散该 DNA 悬液,对照组滴加 2.03 ml PBS 于培养皿中,培养 6 h 后,添加 10 ml 新鲜的 DMEM 生长培养基。继续在 37 ℃的培养箱中培养 66 ~ 72 h。培养结束后,收集细胞和少量培养基于 15 ml 的离心管中,进行 4 次冰冻(-70 ℃)和解冻(37 ℃)循环,每次持续 10 min,每次结束均有简短的涡旋。结束后室温 10 000 × *g* 离心 10 min。收集病毒上清。

1.2.3　BMSCs 分离培养、诱导分化及流式细胞仪检测　　取 4 ~ 6 周龄 BALB/c 小鼠,脱颈处死,75% 乙醇浸泡 5 min,无菌条件下分离小鼠股骨和胫骨,0.01 mol/L PBS 反复冲洗骨髓腔,制成单细胞悬液,在离心管内沿管壁缓慢加入等体积 Percoll 细胞分离液,2 000 r/min 离心 20 min,吸取中间白膜层细胞入另一离心管内,并用无菌 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次;培养液重悬细胞,调整细胞数至 1×10^6 ml^{-1},37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的培养箱内进行培养,24 h 后全量换液,待细胞长至 80% ~ 90% 时进行传代。取生长状态良好的第 3 代细胞,当细胞达到 70% 左右时加成骨诱导剂进行成骨诱导。第 3 代 MSCs 达到 80% 左右时,消化后配成 5×10^6 ml^{-1} 的单细胞悬液,取 50 μl 细胞悬液,分别加入 FITC 标记的抗鼠 CD34、CD44、CD45、CD90 抗体,置 4 ℃闭光孵育 30 min,PBS 洗 2 次,流式细胞仪分析。

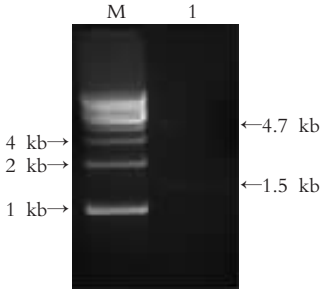
1.2.4　rAAV-BMP-7 转染 BMSCs　　取生长状态良好的第 3 代细胞,按每孔 5×10^4 个细胞接种于 12 孔培养板中,待细胞达到 70% ~ 80% 融合时,每孔添加终浓度为 4 mmol/L 羟基脲和 1 mmol/L 的丁酸脲,混匀,培养 5 ~ 6 h 后,吸出培养基,加入 1.5 ml 预温的含 18% 胎牛血清的培养基和 rAAV-BMP-7 病毒储存液 0.5 ml,继续培养 48 h。免疫细胞化学方法检测 BMSCs 表达 BMP-7 的情况,计算转染率。

1.2.5　BMSCs 的移植及组织学观察　　收集未转染及转染 rAAV-BMP-7 的 BMSCs,制备单细胞悬液,PBS 调整细胞数至 1×10^7 ml^{-1}。60 只 BALB/c 小鼠行总剂量为 8.0 Gy ^{60}Co γ 射线全身照射,照射后随机分为 3 组,每组 20 只:①照射对照组:照射后每只小鼠经尾静脉输入 PBS 0.5 ml;②单纯移植组:照射后每只小鼠尾静脉注射 BMSCs 0.5 ml;③修饰移植组:照射后每只小鼠尾静脉注射转染 rAAV-BMP-7 的 BMSCs 0.5 ml。移植结束后继续饲养 4 周,每周各组分别取 5 只小鼠,在 3% 戊巴比妥钠麻醉下用 4% 多聚甲醛全身灌注,取出肾脏组织,石蜡包埋、切片,BMP-7 免疫组化染色。

2　结果

2.1　pAAV-BMP-7 的酶切鉴定

重组质粒 pAAV-BMP-7 经 *Hind*Ⅲ/*Sal* Ⅰ双酶切后,进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,分别得到大小为 1.5 kb 和 4.7 kb 的条带,表明重组质粒 pAAV-BMP-7 的构建正确(图 1)。



M: DNA 标准; 1: *Hind*Ⅲ/*Sal* Ⅰ双酶切重组质粒

图 1　pAAV-BMP-7 的酶切电泳图

2.2　rAAV-BMP-7 的产生

分别取质粒 pAAV-BMP-7、pAAV-RC、pHelper 各 10 μg,经磷酸钙沉淀法共转染 HEK-293 细胞 2 ~ 3 d。与未转染 DNA 的细胞对比,转染细胞肿胀、变圆、脱壁漂浮,培养基颜色由橙黄色变为黄色。

2.3　BMSCs 的培养及鉴定

BMSCs 接种后 24 h 在相差显微镜下观察,可见大量圆形贴壁细胞,极少数细胞伸展呈成纤维样或多角形;4 ~ 5 d 后可见细胞呈克隆样生长,于接种后 8 ~ 9 d 达 80% 左右融合;传代后细胞生长迅速,传至第 3 代时,细胞形态比较均一,大部分细

胞为成纤维样细胞(图2)。第3代细胞流式细胞仪检测CD44阳性率89.98%、CD90阳性率97.67%,CD34、CD45均为阴性;成骨诱导2周碱性磷酸酶染色阳性。

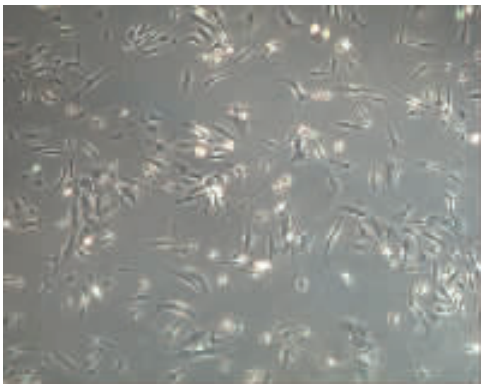


图2 第3代BMSCs相差显微镜观察 (×100)

2.4 转染结果

rAAV-BMP-7转染BMSCs 48 h后,免疫细胞化学染色,光镜观察,约60%的BMSCs表达BMP-7蛋白(图3)。



图3 修饰移植组BMSCs表达BMP-7的免疫细胞化学染色结果 (SABC×200)

2.5 移植后观察

小鼠经^{60}Co γ射线照射后,出现不同程度的少食、少动、体质量减轻等症状,其中20只小鼠未到取材时间已死亡。肾脏组织BMP-7免疫组化染色可见。单纯照射组及单纯移植组小鼠,BMP-7仅在肾小管上皮细胞表达(图4);而修饰移植组小鼠肾小管上皮细胞及部分肾小球内均可见BMP-7表达(图5)。随着观察时间的延长,肾小球内表达BMP-7的细胞增多。

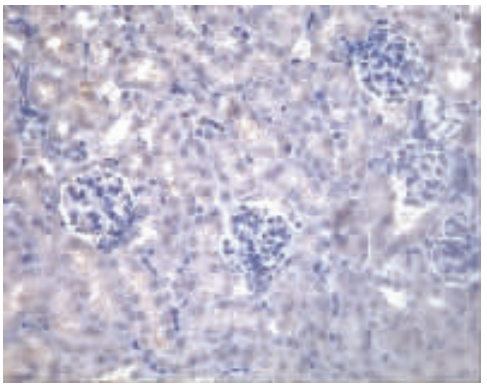


图4 对照组肾脏组织BMP-7的表达 (SABC×400)

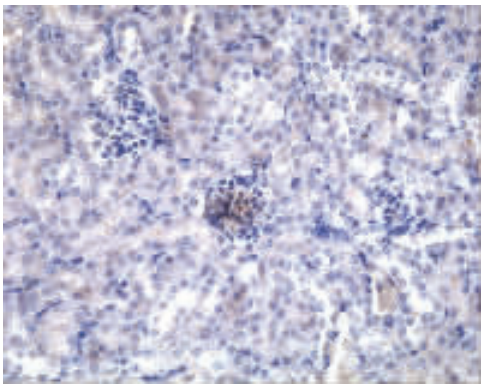


图5 修饰移植组BMP-7在肾小球内的表达 (SABC×400)

3 讨论

骨形态发生蛋白-7,也称为成骨蛋白-1,属于转化生长因子-β超家族成员,最初是从骨基质中分离纯化得到,近几年研究表明BMP-7与肾脏关系密切。在哺乳动物胎肾和成年肾脏中,BMP-7含量最丰富。BMP-7不仅能够维持和促进正常肾组织的发育、形成,还可以拮抗TGF-β对系膜细胞的刺激作用,减少系膜基质的增多,可以显著下调TNF-α诱导小管细胞表达IL-6、IL-1β、MCP-1、IL-8、ET-2等前炎性细胞因子,抑制IL-1诱发人系膜细胞表达单核细胞趋化蛋白-1,拮抗TGF-β对小管上皮-间质的转分化作用,在维持正常肾脏功能,抑制肾小球和肾间质纤维化中具有重要作用[4]。Borovecki等[5]发现将碘化BMP-7通过尾静脉注入怀孕大鼠体内,BMP-7能够透过胎盘屏障促进胎儿器官,特别是肾脏的生长发育,并且在维持正常肾脏功能中具有重要作用。Morrissey等[6]发现BMP-7基因敲除的小鼠因不能发生后肾间充质-上皮细胞转分化在出生后不久即死亡。周剑锋等[7]通过动态观察单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化程度与肾组织内BMP-7、TGF-β_1的表达发现,在UUO大鼠模型中BMP-7的表达明显降低,且随纤维化进程进行性下降。而TGF-β_1的表达则刚好与此相反,在正常肾脏中表达甚少,但随着肾间质纤维化的进展,其表达逐渐增多。Yanagita[8]制备了USAG-1基因缺陷小鼠单侧输尿管梗阻慢性肾衰模型,发现由于小鼠体内缺乏USAG-1蛋白,减少了对BMP-7的拮抗作用,小鼠肾脏纤维化程度明显减轻,存活时间明显延长。Wang等[9]报道BMP-7能逆转糖尿病肾病造成的肾脏肥大,改善肾小球滤过率,减少足细胞的丢失。Boucher等[10]也发现BMP-7具有减轻肾组织损伤、保护肾功能的作用。BMP-7还具有诱导成骨活性和修复骨缺损的能力,能够在体内和体外诱导骨、软骨和牙本质的再生形成。

BMSCs 是目前公认的基因治疗中有希望的运载细胞,该细胞具有易获得、易培养、低免疫原性,能在宿主体内长期存活,易于携带外源基因和长期表达等优点,并且可以参与病变组织的重建,已作为理想的种子细胞广泛应用于组织工程、细胞移植、基因治疗等领域[11]。目前研究表明 BMSCs 具有向肾脏实质细胞分化的潜能,可以参与肾脏损伤后的再生和修复,具有保护肾脏,改善肾功能的作用[12]。因此我们选用 BMSCs 作为运载细胞,采用国际上通用的密度梯度离心法对 BMSCs 进行培养及鉴定。结果显示分离培养的细胞,其原代呈集落样生长,传代后类似成纤维样细胞形态特征,可以向成骨方面分化,流式细胞仪检测 CD44 阳性率 89.98%、CD90 阳性率 97.67%,CD34、CD45 均为阴性,证明所培养的细胞即为 BMSCs。

在基因治疗载体的选择方面,AAV 具有更多的优势。AAV 属微小病毒科,是一类单链 DNA 缺陷病毒,不能独立存在,只有在辅助病毒存在的条件下才能在感染的宿主细胞中复制[13,14]。AAV 以膜结合的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖为受体,以人成纤维细胞生长因子 1(fibroblast growth factor-1,FGF-1)和 αVβ5 整联蛋白为辅助受体,使其能够感染多种细胞,但并不是对所有细胞都有较高的转染效率。本实验结果显示,AAV 对 BMSCs 的转染效率较高。

细胞治疗和基因治疗联合应用较单一方法治疗更有优势,转基因的细胞既能大量分泌治疗基因,又能参与组织新生。但是携带治疗基因的细胞移植入体内后是否能够在肾脏内定植,仍需进一步研究。本实验将转染 BMP-7 的 BMSCs 移植入经 ^{60}Co γ 射线照射的小鼠体内,在不同时相点取肾脏组织,观察 BMP-7 的表达情况。在正常肾脏组织及单纯移植组,BMP-7 仅在肾小管上皮表达;而修饰移植组,BMP-7 在肾小管上皮及部分肾小球内均可见表达,并且随着移植时间的延长,肾小球内表达 BMP-7 的细胞有增多。此结果表明,携带 BMP-7 基因的 BMSCs 不仅可以在肾脏内定植,而且随着时间的延长,该类细胞可见增殖。以往研究表明,BMSCs 可以参与肾脏损伤的修复,BMP-7 具有抗炎、抗纤维化,减轻肾组织损伤、保护肾功能的作用,因此,将携带 BMP-7 的 BMSCs 移植入肾病患者体内后,BMSCs 可以参与病变组织的修复,所产生的 BMP-7 蛋白可以减轻各种病因对肾组织损伤,有望更好的治疗肾脏疾病。

本实验中,我们采用基因克隆技术,构建了含 BMP-7 基因的腺相关病毒,该病毒可以有效地转染 BMSCs,将细胞移植入体内后,可在肾脏内定植及增殖。这一结果为 AAV 载体携带治疗基因联合 BMSCs 治疗肾脏疾病提供了实验基础。

参考文献:

[1] Negri A L. Prevention of progressive fibrosis in chronic renal diseases: antifibrotic agents[J]. J Nephrol, 2004, 17(4): 496 – 503.

[2] Ogutmen B, Tuglular S, Cakalagaoglu F, *et al*. Transforming growth factor-beta1, vascular endothelial growth factor, and bone morphogenic protein-7 expression in tacrolimus-induced nephrotoxicity in rats[J]. Transplant Proc, 2006, 38(2): 487 – 489.

[3] Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, *et al*. Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 285(6): F1060 – F1067.

[4] Sugimoto H, Grahovac G, Zeisberg M, *et al*. Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new mouse model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenic protein-7 and advanced glycation end product inhibitors[J]. Diabetes, 2007, 56(7): 1825 – 1833.

[5] Borovecki F, Jelic M, Grgurevic L, *et al*. Bone morphogenetic protein-7 from serum of pregnant mice is available to the fetus through placental transfer during early stages of development[J]. Nephron Exp Nephrol, 2004, 97(1): 26 – 32.

[6] Morrissey J, Hruska K, Guo G J, *et al*. Bone morphogenetic protein – 7 improve renal fibrosis and accelerates the return of renal function[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13: S14 – S21.

[7] 周剑锋, 袁发焕,李　娜, 等. 大鼠输尿管梗阻后肾组织骨形态发生蛋白-7 的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(7): 614 – 617.

[8] Yanagita M. Modulator of bone morphogenetic protein activity in the progression of kidney diseases[J]. Kidney Int, 2006, 70(6): 989 – 993.

[9] Wang S, de-Caestecker M, Kopp J, *et al*. Renal bone morphogenetic protein-7 protects against diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(9): 2504 – 2512.

[10] Boucher J, Ramsamy T A, Braschi S, *et al*. Apolipoprotein A-Ⅱ regulates HDL stability and affects hepatic lipase association and activity[J]. J Lipid Res, 2004, 45(5): 849 – 858.

[11] 罗　飞, 许建中. 基因增强的骨组织工程研究进展[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(16): 1702 – 1704.

[12] Semedo P, Wang P M, Andreucci T H, *et al*. Mesenchymal stem cells ameliorate tissue damages triggered by renal ischemia and reperfusion injury[J]. Transplant Proc, 2007, 39(2): 421 – 423.

[13] Lee K, Yun S T, Kim Y G, *et al*. Adeno-associated virus-mediated expression of apolipoprotein (a) kringles suppresses hepatocellular carcinoma growth in mice[J]. Hepatology, 2006, 43(5): 1063 – 1073.

[14] Ye X, Zhu T, Bastacky S, *et al*. Prevention and reversal of lupus in NZB/NZW mice by costimulatory blockade with adeno-associated virus-mediated gene transfer[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(12): 3975 – 3986.

(编辑　吴培红)