论著

文章编号:1000-5404(2011)15-1590-04

hBMP-7修饰的骨髓间充质干细胞对肾脏BMP-7的影响

方针强,刘永亮,王祥卫,易善红,贾维胜,陈 伟,何 凡,沈崇星,叶 钢 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院泌尿外科,全军肾脏病中心)

[摘要] **目的** 观察人骨形态发生蛋白-7(hBMP-7)基因修饰的骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)移植对缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)肾脏内源和外源BMP-7表达的影响,探讨其对IRI肾脏的保护作用。**方法** 45只兔采用随机数字表的方法分为对照组(Ⅰ组)、单纯BM-MSCs移植组(Ⅱ组)和基因修饰的BM-MSCs移植组(Ⅲ组)(n=15)。构建hBMP-7重组腺病毒并转染兔BM-MSCs,建立肾脏IRI模型后,移植组于肾血流恢复后经肾动脉推注单纯和基因修饰的自体BM-MSCs,对照组同法推注等量生理盐水。3组分别于术后3、7、14 d采用随机数字表的方法取5只兔经耳缘静脉采血,检测血清肌酐(Crea)和尿素(Urea),观察肾功能情况;同时取肾组织进行HE染色行肾小管损伤评分,ELISA和RT-PCR法分别检测肾脏hBMP-7和BMP-7的蛋白浓度和mRNA表达。**结果** 肾脏IRI后3、7、14 d,Ⅲ组Crea和Urea明显低于Ⅰ组和Ⅱ组(P<0.05);Ⅲ组肾小管损伤评分均低于Ⅰ组和Ⅱ组(P<0.05);Ⅲ组检测到第3、7、14天hBMP-7蛋白[(81.8±25.5)、(107.8±33.4)、(49.6±17.8)pg/mg]和mRNA(0.82±0.12、0.69±0.13、0.42±0.10)的表达并维持至少2周;Ⅲ组第3、7、14天BMP-7 mRNA(1.08±0.33、1.36±0.17、1.64±0.21)和BMP-7蛋白(95.9±21.3、137.0±14.9、192.1±18.0)的表达均高于Ⅰ组和Ⅱ组(P<0.05)。**结论** hBMP-7基因修饰的BM-MSCs移植既能携带外源性hBMP-7在缺血再灌注损伤肾脏中表达,又能提高内源性BMP-7的表达,减轻肾脏损伤,促进肾脏修复,改善肾脏功能。

[关键词] 骨形态发生蛋白-7;骨髓间充质干细胞;肾脏;缺血再灌注损伤;移植

[中图法分类号] R692; R364.12; R394.2 [文献标志码] A

hBMP-7-modified bone marrow mesenchymal stem cells attenuate kidney ischemia-reperfusion injury in rabbits

Fang Zhenqiang, Liu Yongliang, Wang Xiangwei, Yi Shanhong, Jia Weisheng, Chen Wei, He Fan, Shen Chongxing, Ye Gang (Center of Renal Diseases, Department of Urinary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of transplantaiton of human bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) expressed bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) on the expression of endogenous and exogenous hBMP-7 in the kidney after ischemia-reperfusion injury (IRI), and evaluate the protective effects of hBMP-7-expressed BM-MSCs transplantation. **Methods** A total of 45 rabbits were divided randomly into three groups (n=15): control group, BM-MSCs transplantation group and hBMP-7-expressed BM-MSCs transplantation group. After the establishment of kidney IRI in the left kidney, the animals received an infusion *via* renal artery of 1 ml normal saline, BM-MSCs or hBMP-7-expressed BM-MSCs (2×10^7). Blood samples and kidney was taken at the time points of 3, 7 and 14 d after the injury. Serum levels of creatinine and urea were detected to evaluate renal function. The damage of renal tubules was evaluated by HE staining. The expression of BMP-7 and hBMP-7 were detected with ELISA and RT-PCR methods. **Results** Serum levels of creatinine and urea were significantly lower in the group injected with hBMP-7-expressed BM-MSCs than in the other 2 groups (P<0.05), so did the damage in renal tubules at the 3 time points (P<0.05). The protein level of hBMP-7 was 81.8±25.5, 107.8±33.4 and 49.6±17.8 pg/mg respectively in the group at the 3 time points, while that of mRNA was 0.82±0.12, 0.69±0.13 and 0.42±0.10 respectively, both of them were detected for 2 weeks. The protein level of BMP-7 in the group was 95.9±21.3,137.0±14.9, and 192.1±18.0 in the group and that of mRNA was 1.08±0.33, 1.36±0.17 and 1.64±0.21 at the 3 time points, both

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5154)

[通信作者] 叶 钢,电话:(023)68755623,E-mail: doctoregg@126.com

of which were higher than those in the other group ($P<0.05$). **Conclusion** Not only can hBMP-7-expressed BM-MSCs take exogenous hBMP-7 to IRI kidney, but also improve the expression of endogenous BMP-7, thereby, attenuate the renal damage and promote the renal functional repair.

[**Key words**] bone morphogenetic protein-7; bone marrow mesenchymal stem cells; kidney; ischemia-reperfusion injury; transplantation

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5154). Corresponding author: Ye Gang, Tel: 86-23-68755623, E-mail: doctoregg@126.com

肾脏缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)引起的急性肾功能衰竭是临床上常见的问题,其治疗措施有限,死亡率为30% ~50%[1]。骨形态发生蛋白-7(bone morphogenetic protein-7,BMP-7)对肾脏发育发挥着重要的作用,对维持肾脏正常生理功能以及肾脏病理生理变化等方面也有重要的作用。IRI后肾脏BMP-7的表达降低[2-3]。本研究旨在观察人骨形态发生蛋白-7(human bone morphogenetic protein-7, hBMP-7)基因修饰的骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)移植对缺血再灌注损伤肾脏内源和外源BMP-7表达的影响,探讨其对IRI肾脏的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Percoll淋巴细胞分离液(Pharmacia公司),DMEM培养基和胎牛血清(Gibco公司),RNAout(绵阳天泽基因公司),PCR引物(上海生工),BMP-7 ELISA试剂盒(R&D Systems公司)。

1.2 方法

1.2.1 hBMP-7重组腺病毒的制备 参照文献[4]构建hBMP-7重组腺病毒(Ad-hBMP-7),经HEK293细胞包装后,冻融裂解再次感染HEK293细胞,反复多次待病毒滴度达到要求后收集病毒液,储存备用。

1.2.2 实验动物 健康新西兰大白兔45只,6~8周龄,体质量(1.5±0.3)kg,由第三军医大学新桥医院实验动物中心提供。

1.2.3 兔BM-MSCs的取材、分离、培养及腺病毒转染 参照文献[5]进行兔BM-MSCs的取材、分离、培养。细胞移植前24 h,取P3代生长良好的兔BM-MSCs,按MOI为100并根据分组情况分别在其培养液中加入腺病毒液Ad-hBMP-7或Ad-EGFP感染后继续培养备用。

1.2.4 兔肾脏冷缺血再灌注损伤模型的建立及分组 参照文献[5]建立模型。45只兔采用随机数字表的方法分为3组(n=15)。对照组(Ⅰ组):左肾血流复灌后经肾动脉导管注入1 ml生理盐水;对照病毒Ad-EGFP转染后BM-MSCs移植组(Ⅱ组):左肾血流复灌后经肾动脉导管注入培养的自体1 ml BM-MSCs悬液(约2×10^7细胞);Ad-hBMP-7转染后BM-MSCs移植组(Ⅲ组):左肾血流复灌后经肾动脉导管注入自体1 ml Ad-hBMP-7转染后的BM-MSCs悬液(约2×10^7细胞)。

1.2.5 标本采集及检测指标 3组分别于术后3、7、14 d采用随机数字表的方法取5只兔采血后处死,取部分肾组织制作石蜡切片,行常规HE染色后按照李开龙等[6]的方法,参照Paller氏法进行肾小管损伤评分;经耳缘静脉采血,酶联法检测血清肌酐(Crea)和尿素(Urea),观察肾功能情况;取部分肾组织制备1%组织匀浆,参考说明书采用ELISA法测定肾组织hBMP-7和BMP-7浓度。提取肾组织RNA,采用RT-PCR法检测hBMP-7和BMP-7 mRNA表达。PCR引物由上海生工合成。hBMP-7(164 bp),上游引物5′-GCTACGCCGCCTACTACTGTGA-3′,下游引物5′-GAGGACGGAGATGGCATTGAG-3′,94 ℃预变性2 min,98 ℃变性10 s,55 ℃退火30 s,68 ℃延伸60 s,反复循环30次,68 ℃延伸10 min;BMP-7(373 bp),上游引物5′-GCCTACTACTGCGAGGGAGA-3′,下游引物5′-CCACAGCGAGAACGGGAT-3′,94 ℃预变性2 min,98 ℃变性10 s,58 ℃退火30 s,68 ℃延伸60 s,反复循环32次,68 ℃延伸10 min。通过Gel-pro Analyzer 4.5凝胶定量分析软件,以扩增的特异性DNA片段的荧光强度与同时扩增的内参照GAPDH片段的荧光强度比值作为特异性扩增片段的半定量检测值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,多组样本均数的比较采用单因素方差,两两成对比较用SNK法(各组方差齐时)或Dunnett's C法(各组方差不齐时)。

2 结果

2.1 肾功能的测定

兔肾脏IRI后,血清肌酐和尿素均明显升高。Ⅰ组缺血再灌注后第3天肌酐最高,之后恢复缓慢。Ⅱ、Ⅲ组肌酐和尿素虽然也升高,但其升高幅度要小于Ⅰ组,在监测的各时间点,其肌酐和尿素均低于Ⅰ组,差异有统计学意义($P<0.05$)。Ⅲ组肌酐和尿素的升高幅度在各时间点均明显低于Ⅱ组($P<0.05$)。见表1。

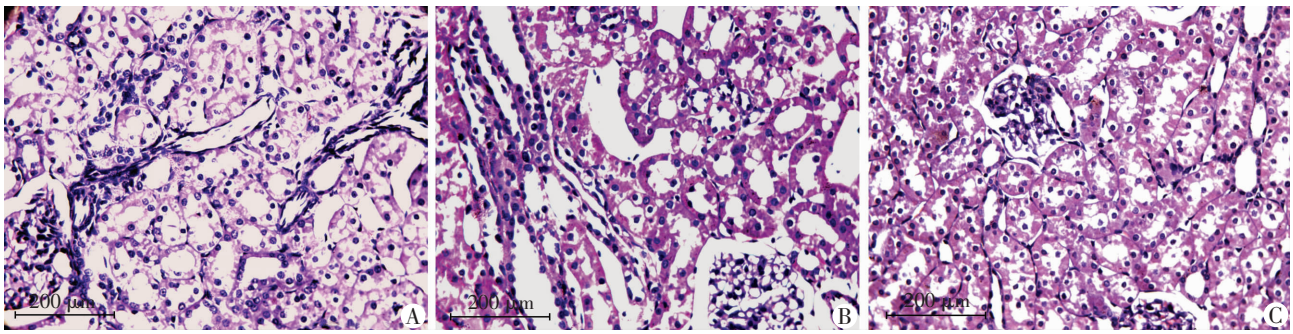
表1 各组不同时间点血清肌酐和尿素检测结果($\bar{x}\pm s$)

组别	肌酐(μmol/L)			尿素(mmol/L)		
	第3天	第7天	第14天	第3天	第7天	第14天
Ⅰ组	326.6±20.0	320.4±14.9	278.6±16.9	22.6±2.6	18.6±1.3	17.4±1.0
Ⅱ组	297.9±18.6^a	275.5±16.6^a	224.1±19.2^a	19.2±1.5^a	16.3±1.4^a	13.9±1.6^a
Ⅲ组	230.0±24.6^{ab}	194.6±18.5^{ab}	123.3±27.8^{ab}	14.6±1.6^{ab}	11.5±1.9^{ab}	9.0±1.8^{ab}

a:$P<0.05$,与Ⅰ组比较;b:$P<0.05$,与Ⅱ组比较

2.2 肾组织HE染色光镜下的组织学改变

第3天HE染色切片光镜下观察:Ⅰ组肾脏组织可见肾小管刷状缘脱落或部分脱落,并见管型,肾小管上皮细胞出现程度较重的肿胀及坏死,肾间质局部出血水肿及炎性细胞浸润(图1A);Ⅱ组肾脏组织学改变相似,多数肾小管刷状缘脱落程



A:Ⅰ组;B:Ⅱ组;C:Ⅲ组

图1 3组肾组织光镜下组织学观察 (HE)

度减轻,肾小管上皮细胞以颗粒样变性和空泡变性为主,水肿程度减轻,有1只肾组织内可见肾小管上皮细胞出现程度较重的肿胀及坏死,偶见管型(图1B);Ⅲ组可见肾组织部分管腔扩张,偶见肾小管刷状缘脱落和管型,肾小管上皮细胞肿胀程度轻微,以颗粒样变性和空泡变性为主(图1C);3组肾小球病变均轻微,少数肾小球可见轻度充血扩张。随着时间的延长,各组的肾脏组织学改变均有不同程度的改善。Ⅲ组各时间点肾小管评分均低于Ⅰ组和Ⅱ组,差异有统计学意义($P<0.05$);Ⅱ组各时间点肾小管评分低于Ⅰ组,差异有统计学意义($P<0.05$)(表2)。

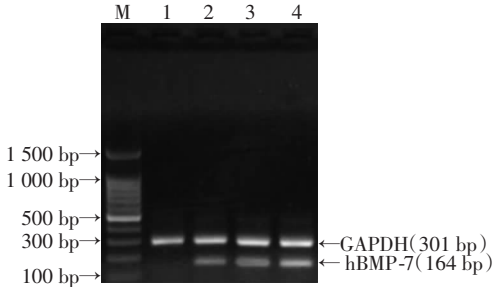
表2 各组不同时间点肾小管损伤评分($\bar{x}\pm s$)

组别	第3天	第7天	第14天
Ⅰ组	3.8±0.4	3.4±0.5	2.6±0.5
Ⅱ组	3.4±0.5[a]	2.8±0.5[a]	1.6±0.4[a]
Ⅲ组	2.8±0.4[ab]	1.6±0.5[ab]	0.8±0.5[ab]

a:$P<0.05$,与Ⅰ组比较;b:$P<0.05$,与Ⅱ组比较

2.3 肾组织hBMP-7浓度、mRNA表达和蛋白含量

Ⅰ和Ⅱ组肾组织中未检测到hBMP-7 mRNA和蛋白的表达。Ⅲ组通过RT-PCR法检测到hBMP-7 mRNA的表达(图2):第3、7、14天分别为0.82±0.12、0.69±0.13、0.42±0.10;ELISA法检测到hBMP-7蛋白的表达:第3、7、14天分别为(81.8±25.5)、(107.8±33.4)、(49.6±17.8)pg/mg。可以看出hBMP-7 mRNA和蛋白检测得到的结果变化一致,在第3天即达到较高水平,并维持到第7天,然后开始缓慢下降,到第14天仍能检测到hBMP-7 mRNA和蛋白的表达。

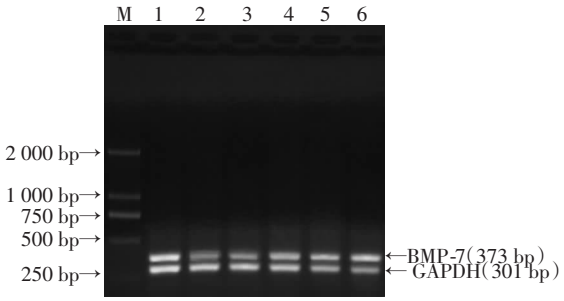


M:DNA标准;1:第Ⅱ组;2~4:第Ⅲ组

图2 RT-PCR检测第7天hBMP-7 mRNA的表达

2.4 肾组织BMP-7 mRNA表达和BMP-7浓度

BMP-7 mRNA和蛋白在缺血再灌注后明显降低($P<0.05$),随着时间延长,开始缓慢升高。其中Ⅲ组BMP-7 mRNA在肾脏缺血再灌注后第3天降低幅度最小,与其他2组比较差异有统计学意义($P<0.05$);Ⅰ组和Ⅱ组BMP-7蛋白的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。到第7天,Ⅲ组BMP-7 mRNA和蛋白的表达均明显高于Ⅰ组和Ⅱ组($P<0.05$)。第14天,3组BMP-7 mRNA和蛋白的表达均升高,其中Ⅲ组最高,其次为Ⅱ组,Ⅰ组升高最慢,差异有统计学意义($P<0.05$)。提示IRI会导致肾脏BMP-7 mRNA和蛋白表达降低,随着肾脏逐渐不同程度地修复,BMP-7 mRNA和蛋白的表达呈相应的升高。见图3,表3、4。



M:DNA标准;1、2:Ⅰ组;3、4:Ⅱ组;5、6:Ⅲ组

图3 RT-PCR检测第7天BMP-7 mRNA的表达

表3 各组不同时间BMP-7 mRNA的表达($\bar{x}\pm s$)

组别	第3天	第7天	第14天
Ⅰ组	0.42±0.05	0.51±0.14	0.51±0.11
Ⅱ组	0.55±0.09	0.79±0.18[a]	0.91±0.19
Ⅲ组	1.08±0.33[ab]	1.36±0.17[ab]	1.64±0.21[ab]

a:$P<0.05$,与Ⅰ组比较;b:$P<0.05$,与Ⅱ组比较

表4 ELISA法检测各组不同时间肾组织BMP-7蛋白浓度(pg/mg,$\bar{x}\pm s$)

组别	第3天	第7天	第14天
Ⅰ组	77.3±8.6	90.4±15.3	103.2±14.9
Ⅱ组	95.5±12.1	111.6±14.8	128.0±16.3[a]
Ⅲ组	95.9±21.3	137.0±14.9[ab]	192.1±18.0[ab]

a:$P<0.05$,与Ⅰ组比较;b:$P<0.05$,与Ⅱ组比较

3 讨论

BMP-7是TGF-β超家族中的一员,主要存在于骨、肾、肾上腺和脑等组织中,通过结合BMP-7家族受体发挥作用[7-8]。BMP-7受体和配体在整个胚胎发育过程中都有表达,其作用是调节细胞的生长、分化、增生和凋亡,并影响细胞系的建立[3,9]。BMP-7对肾脏发育发挥着重要的作用,出生后的肾脏仍是其主要的

表达场所,对于维持肾脏正常生理功能以及肾脏病理生理变化等方面都有重要的作用[2,10]。Tanaka 等[3]研究了肾脏 IRI 模型大鼠 BMP-7 的表达情况,发现缺血后 6~16 h 肾脏 BMP-7 mRNA 表达减少,经 BMP-7 灌注处理后,肾脏功能恢复加快,推测 BMP-7 降低可能参与了 IRI 的发病过程,而应用外源性重组 BMP-7 后,弥补了 BMP-7 的低表达,促进了肾脏功能的恢复。

我们在研究中发现缺血再灌注(Ⅰ组)后 BMP-7 mRNA 和蛋白表达均明显降低,随着时间延长而缓慢恢复,与文献[11]报道一致。在前期实验中,我们结合 BMP-7 在肾脏 IRI 中的治疗作用及特点,利用腺病毒介导外源性 BMP-7 进行体内直接转基因治疗,发现能够保护缺血再灌注损伤的肾脏,但有其使用的局限性:①体内转染效率低;②基因表达的过程无法有效控制,由于缺乏靶向性,会存在异位表达而可能产生副作用;③转基因的腺病毒载体本身具有副作用,特别是为了提高转基因的表达而增加腺病毒数量时,可能会引起免疫反应和不同程度的细胞毒性[12-14]。

目前,随着对 BM-MSCs 特性的进一步认识,利用 BM-MSCs 作为载体细胞携带不同的治疗基因进行各种疾病的治疗成为研究的热点。基于肾脏 IRI 时体内直接转基因治疗的局限性,我们在本实验中考虑采用细胞移植与基因治疗相结合的方法,利用 BM-MSCs 介导外源性 BMP-7 基因治疗进行对 IRI 治疗的研究,并与 BM-MSCs 移植联合治疗进行比较。结果显示:hBMP-7 基因修饰的 BM-MSCs 移植后(Ⅲ组),经 RT-PCR 和 ELISA 法检测到肾脏 hBMP-7 mRNA 和蛋白的表达,明显高于其他治疗组。说明 BM-MSCs 作为载体细胞可以携带 hBMP-7 基因进入损伤肾脏表达,从而提高在肾脏局部的 hBMP-7 含量,这可能与 BM-MSCs 能优先向损伤肾脏迁移的特点有关,因而更利于发挥 hBMP-7 对损伤肾脏的治疗作用,避免在体内其他部位表达可能产生的副作用,具有对损伤肾脏治疗的靶向性。而且 hBMP-7 基因修饰的 BM-MSCs 移植后第 3 天 hBMP-7 mRNA 和蛋白即达到较高水平,并维持到第 7 天,然后开始缓慢下降,到第 14 天仍能检测到 hBMP-7 mRNA 和蛋白的表达,说明利用腺病毒介导 hBMP-7 基因修饰 BM-MSCs 能够在体内稳定高效表达目的基因,维持时间至少 2 周;本实验目的是促进肾脏 IRI 的早期修复,只需要导入的目的基因短期高效稳定地表达,因而完全满足 IRI 的早期治疗需要;同时利用腺病毒不整合到宿主基因组的特性,既可以避免由于长期过量表达 BMP-7 对肾脏或机体的不良影响,又可以避免导致细胞癌变的可能性。

在实验中我们也发现,hBMP-7 基因修饰的 BM-MSCs 移植后,不仅能提高肾脏局部外源性 hBMP-7 的含量,同时还能提高肾脏局部内源性 BMP-7 的含量,推测其可能的原因:①外源性 hBMP-7 在损伤肾脏的表达能够直接诱导肾脏内源性 BMP-7 的表达;②外源性 hBMP-7 能促进缺血再灌注损伤后肾脏的修复,减轻肾脏损伤,从而间接增强肾脏内源性 BMP-7 的表达。

总之,hBMP-7 基因修饰的 BM-MSCs 移植既能携带外源性 hBMP-7 在缺血再灌注损伤肾脏的表达,又能提高缺血再灌注损伤后肾脏内源性 BMP-7 的表达,从而协同发挥作用,减轻肾脏损伤,促进肾脏修复,改善肾脏功能,为肾脏缺血再灌注损伤较理想的治疗方式,其具体作用机制尚待进一步研究。

参考文献:

[1] Huber J M, Tagwerker A, Heininger D, *et al*. The proteasome inhibitor bortezomib aggravates renal ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297(2): F451-F460.
[2] Li T, Surendran K, Zawaideh M A, *et al*. Bone morphogenetic protein 7: a novel treatment for chronic renal and bone disease[J]. Curt Opin Nephrol Hypertens, 2004, 13(4): 417-422.
[3] Tanaka M, Endo S, Okuda T, *et al*. Expression of BMP-7 and USAG-1 (a BMP antagonist) in kidney development and injury[J]. Kidney Int, 2008, 73(2): 181-191.
[4] 方针强, 叶钢, 欧阳一辛, 等. 人 BMP-7 基因重组腺病毒的构建与鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(2): 153-156.
[5] 方针强, 叶钢, 刘永亮, 等. 兔自体骨髓间充质干细胞移植对冷缺血再灌注损伤肾脏细胞增殖与凋亡和肾功能的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(9): 1166-1170.
[6] 李开龙, 何娅妮, 赵玲, 等. 甘草酸 18α 体上调 p53 的表达保护肾脏缺血再灌注损伤的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(22): 2078-2081.
[7] Scherner O, Meurer S K, Tihaa L, *et al*. Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor-beta1 and BMP-7 signaling[J]. J Biol Chem, 2007, 282(19): 13934-13943.
[8] Kirkbride K C, Townsend T A, Bruinsma M W, *et al*. Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type Ⅲ receptor[J]. J Biol Chem, 2008, 283(12): 7628-7637.
[9] Carev D, Saraga M, Saraga-Babic M. Involvement of FGF and BMP family proteins and VEGF in early human kidney development[J]. Histol Histopathol, 2008, 23(7): 853-862.
[10] Feitoza C Q, Goncalves G M, Semedo P, *et al*. Inhibition of COX 1 and 2 prior to renal ischemia/reperfusion injury decreases the development of fibrosis[J]. Mol Med, 2008, 14(11/12): 724-730.
[11] 刘涛, 况应敏, 李纪华, 等. BMP-7 和 TGF-β1 在大鼠肾缺血再灌注损伤后的表达及相关性研究[J]. 昆明医学院学报, 2008, 29(5): 56-59.
[12] Lee R J, Springer M L, Blanco-Bose W E, *et al*. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression[J]. Circulation, 2000, 102(8): 898-901.
[13] Sellke F W. Gene therapy in cardiac surgery: is there a role?[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 125(5): 994-997.
[14] Kinoshita K, Iimuro Y, Otogawa K, *et al*. Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats[J]. Gut, 2007, 56(5): 706-714.

(**收稿**:2011-01-30;**修回**:2011-03-25)
(编辑 龙 亮)