基础研究 文章编号:0253-3626(2011)02-0129-04

双特异抗体增效骨髓间充质干细胞干预心肌纤维化

邓 玮[1],陈庆伟[1],李兴升[1],刘 灏[2],牛司强[3],周 玥[4],李桂琼[1],柯大智[1],莫显刚[1]
(1.重庆医科大学附属第二医院老年病科,重庆 400010;2.重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400016;3.重庆医科大学检验系,重庆 400016;4.重庆医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨在双特异抗体(Bispecific antibody,BiAb)的辅助下,骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)移植干预心肌纤维化的效果。方法:以 anti-CD29(能识别间充质干细胞)和抗肌凝蛋白轻链抗体(Anti-myosin light chain antibody, AMLCA)(能特异性结合损伤心肌)制备 BiAb(CD29 × AMLCA)。将此 BiAb 与雄性小鼠 BMSCs 经尾静脉输入异丙肾性心肌纤维化雌性小鼠(BMSCs+BiAb 组)。另设单纯 BMSCs 组、单纯 BiAb 组、正常对照组、未治疗组。5 周后处死小鼠,荧光定量 PCR 检测心肌 y 染色体鉴别基因(Sex-determining region of Y-chromosome,SRY)、基质金属蛋白酶 -9(Matrix metalloproteinases-9, MMP-9)、基质金属蛋白酶组织抑制剂 -1(Tissue inhibitor of metalloproteinase-1,TIMP-1)的表达。天狼猩红染色比较心脏胶原含量。结果:BMSCs+BiAb 组的干细胞归巢数比 BMSCs 组多($P<0.05$)。与未治疗组相比,BMSCs+BiAb 组和单纯 BMCSs 组的心肌 MMP-9 和 TIMP-1 表达下调,心脏胶原沉积降低($P<0.05$)。与 BMSCs 组相比,BMSCs+BiAb 组的心肌纤维化改善更为明显($P<0.05$)。结论:CD29 × AMLCA 双特异抗体可促进小鼠骨髓间充质干细胞的归巢。BMSCs 归巢后能改善缺血心肌 MMP-TIMP 表达,干预心肌纤维化。

【关键词】骨髓间充质干细胞;双特异性抗体;心肌纤维化;细胞移植
【中国图书分类法分类号】R542.23 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-09-29

Effect of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on fibroid myocardium with the aid of bispecific antibody

DENG Wei, et al
(*Department of Gerontology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation on fibroid myocardium with the aid of bispecific antibody (BiAb). *Methods*: BiAb [anti-CD29 × anti-myosin light chain antibody (AMLCA)] was prepared and combined with isolated BMSCs from male mice and transfused into female mice with isoproterenol-induced myocardial fibrosis via tail vein. This study included five groups: BMSCs+BiAb, BMSCs, BiAb, untreated, and control groups. Five weeks after treatment, expression levels of sex-determining region of Y-chromosome(SRY), matrix metalloproteinases-9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in myocardium were detected by fluorescent qRT-PCR. Collagen distribution was observed using sirius red staining. *Results*: Higher homing number of BMSCs was shown in the BMSCs+BiAb group than that of the BMSCs group ($P<0.05$). Compared with the untreated group, BMSCs+BiAb and BMSCs groups had decreased levels of MMP-9, TIMP-1 and collagen deposition ($P<0.05$). Decreased level of collagen content was significantly different in BMSCs+BiAb as compared to BMSCs group ($P<0.05$). *Conclusion*: Homing rate and repairing efficacy of BMSCs improve via treatment with combination of BiAb. BMSCs can improve MMP-TIMP expression in injured myocardium and interfere with myocardial fibrosis after homing.

【Key words】bone marrow mesenchymal stem cell; bispecific antibody; myocardial fibrosis; cell transplantation

如何有效干预心肌纤维化是缺血性心脏病治疗的目标之一。骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)移植到受损心肌有归巢、修复功能,但其静脉移植途径的归巢效率较低。提高静脉移植 BMSCs 的归巢率有着重要的实用价值。为探讨双特异抗体(Bispecific antibody,BiAb)辅助下的 BMSCs 能否更好地归巢并干预心肌纤维化,我们进行了本项研究。

作者介绍:邓 玮(1978-),女,主治医师,博士,研究方向:老年心血管病学。
通信作者:陈庆伟,男,教授,Email:chenqwcq@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30970826)。

1 材料与方法

1.1 小鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养、鉴定

参照全骨髓贴壁法培养 BMSCs[1,2]。健康 3~4 周龄 SPF

级雄性 BALB/c 小鼠(由重庆医科大学实验动物中心提供),脱颈处死,无菌条件下分离小鼠股骨。用 2 ml 注射器吸取 DMEM/F12 培养液(Gibco)冲出骨髓,2 000 r/min,离心 10 min,取沉淀细胞。用 DMEM/F12 培养液 3 ml 制成骨髓细胞悬液,血细胞计数板计数,以 4×10^5 个/cm^2 接种于 25 ml 培养瓶。培养条件为:DMEM/F12+10%胎牛血清(HyClone),37℃,5% CO_2 饱和湿度的 CO_2 培养箱静置培养,达 90%融合生长后传代。取对数生长期细胞进行试验。

以形态学和功能学指标鉴定 BMSCs。倒置显微镜下观察干细胞形态。诱导成骨培养:将 BMSCs 置于 6 孔板中培养至 80%~90%融合后,弃旧培养基,加入 2 ml/孔的成骨诱导分化完全培养基(Cyagen biosciences,OriCell™)继续培养。每 3 d 换液,连续观察,诱导 3 周后,茜素红染色,甲醛固定,拍照。成脂诱导:将 BMSCs 置于 6 孔板中培养至 80%~90%融合后,其旧培养基,加入 2 ml/孔的成脂诱导分化完全培养基 A(Cyagen biosciences,OriCell™)继续培养。3 d 后更换为成脂诱导完全培养基 B,维持 24 h 后,再次更换为成脂诱导完全培养基 A,如此进行 3 个循环。油红 O 染色,甲醛固定,拍照。

1.2 CD29×AMLCA 双特异抗体的制备

按照化学交联方法[3,4],兔抗小鼠 CD29 抗体(BD pharmingen)按 1:5 摩尔比溶于 Traut's Reagent(Pierce,Rockford,IL)1 h;抗小鼠 AMLCA 单克隆抗体(Abcam,Cambridge)按 1:10 摩尔的比例溶于 Sulpho-SMCC 试剂(Pierce,Rockford,IL)1 h。2 种溶解后的单抗立即以等摩尔比例混合,4℃过夜。非还原性 SDS-PAGE 电泳鉴定 BiAb[3,4]。

1.3 心肌纤维化模型的制作和细胞移植

选取 6 周龄健康雌性 BALB/c 小鼠(重庆医科大学动物实验中心提供)50 只,参考异丙肾上腺素注射液皮下注射法[5]制备小鼠急性心肌损伤心肌纤维化模型。小鼠腹部皮下注射异丙肾上腺素(上海禾丰制药有限公司,批号 080701)50 mg/kg,每天 2 次,连续 10 d。将制成的模型分为 5 组,每组 10 只。末次异丙肾上腺素注射后 1 d,行细胞移植。这 5 组及移植内容(均为 0.1 ml)分别为:①未治疗组,经尾静脉输入 PBS 液 0.1 ml。②单纯 BiAb 治疗组(BiAb 组),经尾静脉输入 50 ng BiAb 交联产物。③单纯 BMSCs 移植组(BMSCs 组),经尾静脉输入 4×10^6 个/kg BMSCs。④BMSCs+BiAb 组,经尾静脉输入 4×10^6 个/kg BMSCs,再输入 50 ng BiAb 混合物。并设⑤正常对照组(造模时皮下注射生理盐水而非异丙肾上腺素),经尾静脉输入 PBS 液 0.1 ml。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.4 实时荧光定量 PCR 分析心肌 Y 染色体鉴别基因(Sex-determining region of Y-chromosome,SRY)、基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinases-9,MMP-9)、基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(Tissue inhibitor of metalloproteinase-1,TIMP-1)表达

细胞移植后 5 周,处死小鼠,摘取心脏,取心尖组织行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)。Trizol 一步法提取总 RNA,紫外分光光度计验证其纯度。常规方法逆转录合成 cDNA。

根据 GeneBank 设计特异性引物。SRY 引物(序列为:F 5'-GAAAAGCCTTACAGAAGCCGA-3',R 5'-GTATGTGATGGCATGTGCGTTC-3'),MMP-9 引物(序列为:F 5'-CACAGCCAACTATGACCAGGAT-3',R 5'-GCTGCCACCAGGAACACG-3'),TIMP-1 引物(序列为:F 5'-CCCCAGAAATCAACGAGACC-3',R 5'-CGCCAGGGAACCAAGAAG-3')和 β-actin 引物(序列为 F 5'-GAGACCTTCAACACCCCAGC-3',R 5'-ATGTCACGCACGATTTCCC-3')由上海闪晶生物科技有限公司合成。

使用 FTC2000(Canada)荧光定量 PCR 仪进行扩增反应。采用 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒(上海闪晶)分别对目的基因进行定量检测。每反应体系包括 cDNA 1 μl,2× PCR Buffer 25 μl,目的基因引物对(25 pmol/μl) 0.6 μl×2,无 RNase 水 22.5 μl,Sybr green Ⅰ(20×)0.3 μl 等;经 94℃ 4 min;94℃ 20 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s 循环 35 次,72℃检测信号。同时检测 β-actin 表达水平作为内参照,生成标准曲线、扩增曲线及熔解曲线,并读取循环阈值(Cycle threshold,Ct)值,采用相对比值法进行计算。

1.5 苦味酸-天狼猩红染色对比心肌胶原含量

石蜡切片脱蜡至水。取左心室横断面中部约 2 mm 厚的组织制成连续石蜡切片,厚度 5 μm,并进行苦味酸-天狼猩红染色[6]。Image-Pro Plus 图像分析软件(Media Cybernetics 公司,美国)行定量分析。

1.6 统计分析

应用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析检验(ANOVA),用 LSD 法进行两两比较,$P<0.05$ 为差异有统计意义。

2 结 果

2.1 小鼠 BMSCs 的鉴定

采用形态学、功能学指标来鉴定培养的 BMSCs[7]。

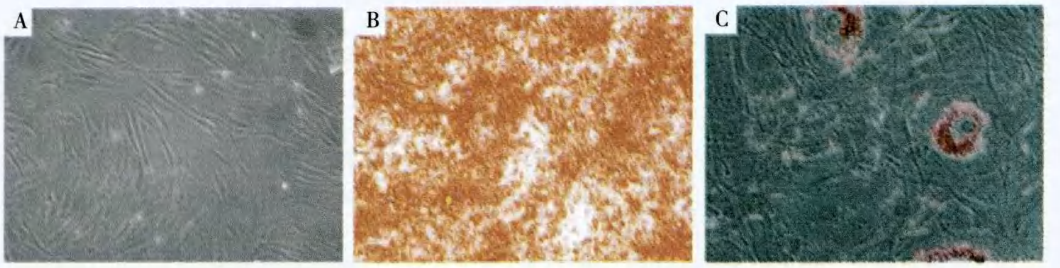
体外培养的 BMSCs 贴壁生长,多为漩涡状或平行排列生长。细胞呈梭形或柳叶形(图 1A)。BMSCs 经成骨诱导后 1 周形态变为多角形,诱导 2 周时可见细胞间钙质沉积,诱导 3 周后可见钙结节明显形成,茜素红染色阳性(图 1B)。BMSCs 经成脂诱导后 1 周形态变得不规则,诱导 2 周时可见胞质内出现折光性较强的小脂粒,诱导 3 周后可见脂滴聚集,油红 O 染色阳性(图 1C)。

2.2 BiAb 的制备

CD29×AMLCA 由化学共轭法[3,8,9]制备,制备产物含 BiAb(约 268 kD)、共轭多聚体(>300 kD)、未连接的单抗 CD29(88 kD)、AMLCA(180 kD),见 SDS-PAGE(图 2)所示。

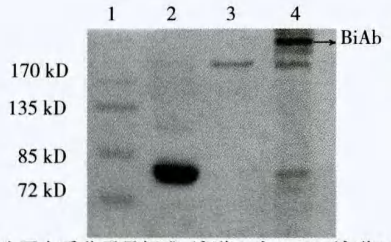
2.3 各组心肌 SRY、MMP-9、TIMP-1 基因表达

SRY 基因为 Y 染色体上的雄性性别鉴定基因,其表达量多寡能表明归巢于心肌的雄性 BMSCs 数量。如表 1 所示,正



A. BMSCs 呈平行排列漩涡状生长(×400); B. 成骨诱导分化 3 周时,钙结节明显形成,茜素红染色阳性(×100);C. 成脂诱导分化 3 周时,见脂滴聚集,油红 O 染色阳性(×200)

图 1 BMSCs 的鉴定



泳道 1 为蛋白质分子量标准;泳道 2 为 CD29;泳道 3 为 AMLCA;泳道 4 为 BiAb 制备产物(除 BiAb 外,还有少量共轭多聚物、CD29 及 AMLCA)

图 2 CD29 与 AMLCA 制备的 BiAb 产物

常组、未治疗组和 BiAb 组几乎无 SRY 基因表达。BMSCs 组和 BMSCs+BiAb 组均有 SRY 表达,与 BMSCs 组相比,BMSCs+BiAb 组的 SRY 基因表达量更多($P<0.05$)。

各组中,正常组心肌的 MMP-9 和 TIMP-1 表达较低,未治疗组心肌的 MMP-9 和 TIMP-1 表达最高($P<0.05$)。与未治疗组相比,BMSCs 组和 BMSCs+BiAb 组的 MMP-9、TIMP-1 表达下降($P<0.05$)。

5 组小鼠心肌组织中 SRY、MMP-9、TIMP-1 基因相对拷贝数见表 1。

2.4 各组心脏胶原纤维的含量比较

苦味酸 - 天狼猩红染色后,心肌细胞呈黄色,Ⅰ、Ⅲ型胶原纤维呈红色,如图 3 所示。未治疗组及 BiAb 组小鼠心脏胶原纤维沉积较多。与未治疗组相比,BMSCs 组和 BMSCs+BiAb 组的心脏胶原纤维含量降低($P<0.05$)。其中,BMSCs+BiAb 组的心脏胶原含量高于 BMSCs 组($P<0.05$)(表2)。

3 讨 论

为探讨 BiAb 辅助下的 BMSCs 能否提高归巢和修复效果,本研究以 CD29 × AMLCA 联合 BMSCs 经尾静脉移植入心肌纤维化小鼠,结果发现:BiAb 能促进 BMSCs 归巢,BMSCs 归巢后能下调纤维化心肌过高的 MMP-9 及 TIMP-1 表达,减轻心肌胶原沉积,干预心肌纤维化。

经外周静脉移植 BMSCs 有着低创伤、易操作的优势,但归巢效率较为低下。采用辅助措施提高 BMSCs 的靶向迁徙数量有着重要意义。本实验的 BiAb 以化学偶联法制备,并采用 SDS-PAGE 电泳法鉴定 BiAb[3,8,9]。BiAb 具有与两种特异性抗原相结合的生物学特性,可以作为损伤心肌和 BMSCs

表 1 5 组心肌 SRY、MMP-9、TIMP-1 基因相对拷贝数($\bar{x} \pm s$)

基因	未治疗组	BiAb 组	BMSCs 组	BMSCs+BiAb 组	正常组
SRY/β-actin	1.05 ± 0.47	1.23 ± 0.47	11.22 ± 0.90[a]	13.57 ± 1.41[a]	1.29 ± 0.62
MMP-9/β-actin	3.06 ± 0.37[a]	2.18 ± 0.24[b]	1.80 ± 0.19[a]	2.01 ± 0.14[b]	0.78 ± 0.05[a]
TIMP-1/β-actin	0.58 ± 0.02[d]	0.59 ± 0.01[d]	0.35 ± 0.01[c]	0.35 ± 0.01[c]	0.15 ± 0.01[a]

注:同一指标组间比较,a. 与其余各组比较,$P<0.05$;b. 与未治疗组、BMSCs 组、正常组相比,$P<0.05$;c. 与未治疗组、BiAb 组、正常组相比,$P<0.05$;d. 与 BMSCs 组、BMSCs+BiAb组、正常组相比,$P<0.05$



未治疗组 BiAb 组 BMSCs 组 BMSCs+BiAb 组 正常组

图 3 各组心脏苦味酸 - 天狼猩红染色比较胶原含量

表 2 各组心脏胶原含量分析

	未治疗组	BiAb 组	BMSCs 组	BMSCs+BiAb 组	正常组
胶原纤维含量(%)	8.44 ± 1.09[a]	7.86 ± 1.54[a]	3.44 ± 0.84[b]	2.12 ± 0.38[c]	1.28 ± 0.33[c]

注:a.与 BMSCs 组,BMSCs+BiAb 组,正常组相比,$P<0.05$;b.与其余各组相比,$P<0.05$;c.与未治疗组,BiAb 组,BMSCs 组相比,$P<0.05$

之间的连接桥梁。AMLCA 是损伤心肌特异性抗体,能专一地识别受损心肌;CD29 是 BMSCs 高表达的阳性分子表型,CD29 抗体能迅速与之结合。CD29 × AMLCA 这一 BiAb 在本研究中,提高了静脉移植 BMSCs 的归巢率,发挥了"快递员"的作用。

Lee RJ 等[3]制备的 BiAb(AMLCA × CD45),能将 CD45+ 的造血干细胞导引至损伤心肌,促进干细胞的归巢。另外一些研究[8,9]也发现 BiAb 能提高干细胞的靶向归巢。我们的研究发现,BiAb 能增加 BMSCs 的归巢,这可能得益于 BiAb 提高干细胞"播种率"的作用。

BMSCs 归巢到受损心肌后,能发挥修复作用。本研究发现,BiAb 辅助下的 BMSCs 不仅能高效归巢,还能发挥积极的心肌纤维化干预效应,其干预效果优于单纯 BMSCs 移植组,提示干细胞归巢量与其修复效果直接相关。BMSCs 移植后能下调过高的 MMP-9 和 TIMP-1 表达,矫正胶原合成 - 降解失衡,干预心肌纤维化进程。

BMSCs 可能通过多种机制干预心肌纤维化。BMSCs 移植到心衰大鼠,能降低心肌Ⅰ、Ⅲ型胶原沉积、降低 MMP-2,9 表达,改善心功能[10]。而且随着 BMSCs 移植数量的增加,梗死心肌病理性胶原纤维沉积量越少、梗死心脏结构功能改善越明显[11]。其机制可能是:首先,移植的 BMSCs 在心梗大鼠心脏有自我增殖能力,能分化为微血管内皮细胞、心肌细胞(少量)等[12]。其次,BMSCs 还通过旁分泌效应(非 BMSCs 自身)使心脏纤维母细胞受到抑制,减少其胶原纤维分泌量[13]。一系列细胞因子均可通过旁分泌效应被激活,进而减少病理性胶原纤维沉积[10]。可见,干细胞独有的归巢和修复能力[14]是BMSCs 干预心肌纤维化的作用机制。

综上所述,BiAb 能增加外源性 BMSCs 移植的归巢率,BMSCs 移植后可下调过高的 MMP-9 和 TIMP-1 表达、减轻心脏胶原沉积,从而有利于受损心肌的早期恢复。

参 考 文 献

[1] Pereira R F, Halford K W, O'Hara M D, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(11): 4857-4861.

[2] Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, et al. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow[J]. J Exp Med, 2009, 206(11): 2483-2496.

[3] Lee R J, Fang Q, Davol P A, et al. Antibody targeting of stem cells to infarcted myocardium[J]. Stem Cells, 2007, 25(3): 712-717.

[4] Sen M, Wankowski D M, Garlie N K, et al. Use of anti-CD3 × anti-HER2/neu bispecific antibody for redirecting cytotoxicity of activated T cells toward HER2/neu+ tumors[J]. J Hematother Stem Cell Res, 2001, 10(2): 247-260.

[5] Brooks W W, Conrad C H. Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates[J]. Comp Med, 2009, 59(4): 339-343.

[6] Whittaker P, Kloner R A, Boughner D R, et al. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light[J]. Basic Res Cardiol, 1994, 89(5): 397-410.

[7] Dominici M, Le B K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-317.

[8] Lum L G, Fok H, Sievers R, et al. Targeting of Lin-Sca+ hematopoietic stem cells with bispecific antibodies to injured myocardium[J]. Blood Cells Mol Dis, 2004, 32(1): 82-87.

[9] Zhao T C, Tseng A, Yano N, et al. Targeting human CD34+ hematopoietic stem cells with anti-CD45 × anti-myosin light-chain bispecific antibody preserves cardiac function in myocardial infarction[J]. J Appl Physiol, 2008, 104(6): 1793-1800.

[10] Li L, Zhang Y, Li Y, et al. Mesenchymal stem cell transplantation attenuates cardiac fibrosis associated with isoproterenol-induced global heart failure[J]. Transpl Int, 2008, 21(12): 1181-1189.

[11] Dixon J A, Gorman R C, Stroud R E, et al. Mesenchymal cell transplantation and myocardial remodeling after myocardial infarction[J]. Circulation, 2009, 120(11s): 220-229.

[12] Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction[J]. Nat Med, 2006, 12(4): 459-465.

[13] Mias C, Lairez O, Trouche E, et al. Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction[J]. Stem Cells, 2009, 27(11): 2734-2743.

[14] Segers V F, Lee R T. Stem-cell therapy for cardiac disease[J]. Nature, 2008, 451(7181): 937-942.

(责任编辑:冉明会)