

尾静脉注射 BMP-7 过表达质粒在小鼠脏器中的表达*

彭伟^{1,2,3}, 刘慧铭^{1,2}, 梁露群^{1,2}, 伍聪聪³, 徐卫卫³, 周星丞^{1,2}, 王圆圆^{1,2}, 刘丽荣^{3**}, 桂华珍⁴, 郭兵^{1,2}
(1. 贵州医科大学 基础医学院 病理生理学教研室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学 贵州省常见慢性疾病发病机制及药物研究重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学 检验学院 血液学教研室, 贵州 贵阳 550025; 4. 贵州医科大学 基础医学院 多媒体教研室, 贵州 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 研究尾静脉注射骨形成蛋白 7 (BMP-7) 过表达质粒在小鼠心、肝、肺和肾脏组织中的表达及其安全性。方法: 将 30 只小鼠随机分为正常组 (NC 组)、空载质粒组 (NC + Vector 组) 以及 BMP-7 过表达质粒组 (NC + BMP-7 组), NC + BMP-7 组和 NC + Vector 组分别通过尾静脉注射 BMP-7 过表达质粒或空载质粒, 每周 1 次共注射 6 周, 6 周后处死小鼠取动脉血, 检测血清中小鼠胆固醇、甘油三酯和血糖含量, 收集小鼠心、肝、肺和肾脏组织, 采用 HE 染色观察小鼠肝脏和肾脏组织形态变化, 试剂盒比色法检测肝组织中天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 和丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 活力, Western Blot 检测各组织中 BMP-7 表达。结果: 与 NC 组比较, NC + Vector 组和 NC + BMP-7 组小鼠胆固醇、甘油三酯和血糖无明显变化, 肝、肾组织显微镜观察无明显形态学改变, 肝组织中 AST 和 ALT 的活力无明显增高, 但小鼠心、肝、肺和肾脏组织中 BMP-7 蛋白明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 通过尾静脉注射 BMP-7 过表达质粒可以在小鼠心、肝、肺和肾脏中高表达, 且不具有明显的肝、肾毒性。

[关键词] 尾静脉; 质粒; 骨形成蛋白 7; 小鼠, 近交 C57BL; 组织学观察
[中图分类号] R459.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)10-1192-06
DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.10.014

Expression of BMP-7 Expression Plasmid in Mouse Viscera
by Intravenous Injection

PENG Wei^{1,2,3}, LIU Huiming^{1,2}, LIANG Luqun^{1,2}, WU Congcong³, XU Weiwei³, ZHOU Xingcheng^{1,2},
WANG Yuanyuan^{1,2}, LIU Lirong³, GUI Huazhen⁴, GUO Bing^{1,2}
(1. Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China;
2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pathogenesis & Drug Research on Common Chronic Diseases, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. Department of Clinical Hematology, School of Medical Diagnostics, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 4. Department of Multimedia Teaching and Research, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression and safety of bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) in rat hearts, livers, lungs and kidney tissues. **Methods:** 30 mice were randomly divided into normal group (NC group), no-load plasmid group (NC + Vector group) and BMP-7 expression plasmid group (NC + BMP-7 group). By injecting the rat tail vein with BMP-7 expression plasmid and empty plasmid once a week for 6 weeks in NC + BMP-7 group and NC + Vector group respectively, the mice were executed six weeks later to take blood and take hearts, livers, lungs and kidney tissues. The serum was used to detect cholesterol, triglycerides, and blood sugar in mice. HE staining was used to observe the

*[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81760131); 贵州省科学技术基金[黔科合基础(2016)1117]; 贵州省教育厅青年科技人才成长项目[黔教合 KY 字(2016)150]
** 通信作者 E-mail: 249018257@qq.com
网络出版时间: 2018-10-10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181010.2224.018.html>

changes in livers and kidney tissues in mice. The reagent box colorimetry was used to detect the activity of alanine aminotransferase (ALT) and glutamate aminotransferase (AST) in liver tissues. The expression of BMP-7 in various organizations was detected by Western Blot. **Results:** There were no significant changes in cholesterol, triglycerides and blood sugar in NC + Vector group and NC + BMP-7 group after plasmid injection, and there was no obvious change in morphology, and no increase in aminotransferase and aminotransferase. BMP-7 protein was significantly increased in the hearts, livers, lungs and kidney tissues of mice. **Conclusion:** BMP-7 expression plasmid can be expressed high in the hearts, livers, lungs and kidneys of mice and There is no obvious toxicity of livers or kidneys.

[**Key words**] tail vein; plasmid; bone morphogenetic protein 7; mice, C57BL; histological observation

骨形态蛋白 7 (bone morphogenetic protein 7, BMP-7) 是一种 35 kD 的同型二聚体分泌型糖蛋白,属于转化生长因子- β (TGF- β) 超家族。有研究表明,BMP-7 具有抗肾脏纤维化、促进骨骼生长等作用^[1-2]。目前,在基础研究中应用人重组 BMP-7 细胞因子需要反复大剂量注射才能达到实验效果,其价格极其昂贵。有研究表明,通过体内基因转移技术尾静脉水流动力学注射质粒能使目的基因程序性细胞死亡蛋白-1 (PD-L1) 在体内高效表达^[3], Kohji 等^[4] 也通过尾静脉注射 BMP-7 质粒治疗大鼠的肝纤维化。所以,本实验通过尾静脉注射 BMP-7 过表达质粒,检测 BMP-7 在小鼠脏器中的表达。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

雄性 C57BL 小鼠 (SPF 级), 体质量 (26 ± 2) g [SCXK (京) 2016 - 0002, 斯贝福 (北京) 生物技术有限公司]。BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL 显影液、Western Blot 一抗稀释液 (北京碧云天公司)、无内毒素质粒大提试剂盒 (北京天根公司)、辣根过氧化物酶标记兔抗 IgG 抗体、rabbit-anti- β -actin (武汉普美生物公司)、rabbit-anti-BMP-7 (Protein-tech 公司)、PVDF 膜、3 mm Whatman 滤纸 (美国 Millipore 公司)、天门冬氨酸氨基转移酶测试盒、丙氨酸氨基转移酶测试盒 (南京建成生物工程研究所)。

1.2 方法

1.2.1 质粒准备 含 BMP-7 过表达质粒甘油菌购于上海丰博生物科技有限公司,质粒图谱见图 1。实验当日挑取少量菌液在固体 LB 培养基中进行划线,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 ~ 16 h。次日,挑取单克隆菌于 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴摇床中摇菌 12 h。

根据无内毒素试剂大提试剂盒说明书,将菌液用试剂 P1、P2 和 P4 进行裂解,加入去内毒素溶液 ER 去除内毒素,所得溶液过吸附柱,最后用漂洗液 PW 漂洗两次,晾干,用洗脱液 EB 将质粒从吸附柱上洗脱下来,用微量核酸蛋白分析仪检测质粒浓度和纯度,当纯度 A260/ A280 在 1.8 ~ 2.0 视为可用,所得质粒 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

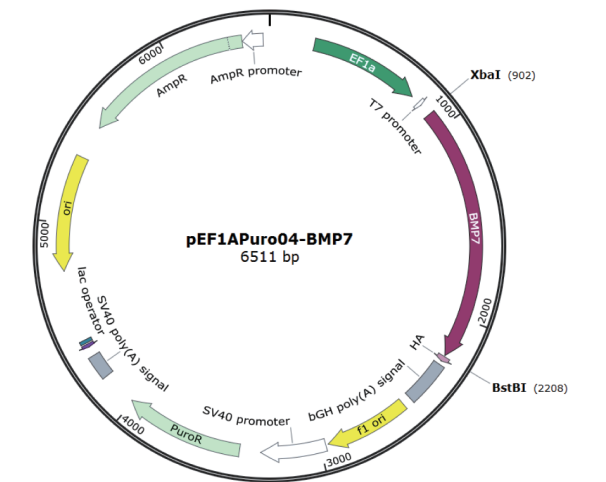


图 1 BMP-7 过表达质粒
Fig. 1 BMP-7 overexpression plasmid map

1.2.2 分组及质粒注射 将小鼠随机分为正常组 (NC 组)、空载质粒组 (NC + Vector 组) 以及 BMP-7 过表达质粒组 (NC + BMP-7 组), 每组 10 只。NC + BMP-7 组和 NC + Vector 组分别通过尾静脉注射 BMP-7 过表达质粒或空载质粒,注射液均现用现配,每周注射 1 次,共 6 周。小鼠注射之前称重,禁食 3 h 后用戊巴比妥钠溶液按 65 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉 (戊巴比妥钠溶解于高压灭菌后冷却的双蒸水中配成 65% 的溶液), 每只小鼠质粒注射的剂量为 15 μg , 用冷却的林格液 0.2 mL 稀释 (高压灭菌),从小鼠尾静脉后端 1/3 处开始注射。3 组

小鼠均饲养 6 周,禁食 3 h 后乙醚麻醉,股动脉放血并收集血液,4 ℃ 离心取上清,开腹取心、肝、肺以及双侧肾脏,部分肝脏和肾脏置于福尔马林中固定,余下组织保存于 -80 ℃。

1.2.3 小鼠心、肝、肺和肾脏组织中 BMP-7 蛋白测定 分别取心、肝、肺和肾脏组织加入蛋白裂解液充分研磨裂解,4 ℃ 离心 20 min 取上清,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定样本中的蛋白浓度,用 1.5 × loading Buffer 溶液将蛋白样本稀释至 5 g/L,置于 100 ℃ 水浴 15 min 用于上样。制胶、上样、电泳、转膜、封闭后,加入特异性 rabbit-anti-β-actin (1:5 000) 和 rabbit-anti-BMP-7(1:1 000),置于 4 ℃ 摇床上孵育过夜,TBST 洗膜 5 min × 3 次,特异性二抗孵育 1 h 后 TBST 洗膜 5 min × 3 次,TBS 洗膜 10 min,ECL 显影曝光,Bio-Rad 凝胶成像系统扫描,Image pro plus 软件分析各条带吸光度值。

1.2.4 肝脏和肾脏组织病理观察 采用福尔马林固定肝脏和肾脏组织,制成 3 μm 厚的石蜡切片,行 HE 染色,光学显微镜观察组织学变化。

1.2.5 肝组织中天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 和丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 测定 称取 0.04 g 肝组

织,加入生理盐水 0.4 mL 混合,于匀浆器中冰上匀浆,2 500 r/min 离心 10 min 取上清,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定样本蛋白浓度。其中测定 AST 样本稀释 10 倍,测定 ALT 样本稀释 35 倍,按照测试盒说明书,采用比色法测定各组样本中 AST 和 ALT 活力。

1.3 统计学处理

所有数据用 SPSS 17.0 统计软件分析处理,数据均用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据通过方差齐性检验、符合正态分布检验后,组间比较采用单因素方差 SNK 法进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况和血生化指标

与 NC 组相比,实验第 1 ~ 6 周 NC + Vector 组和 NC + BMP-7 组小鼠在进食、饮水量及尿量无明显差异,体质量逐渐增加。小鼠血液生化检测结果显示,胆固醇、甘油三酯和血糖 3 组间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 2。

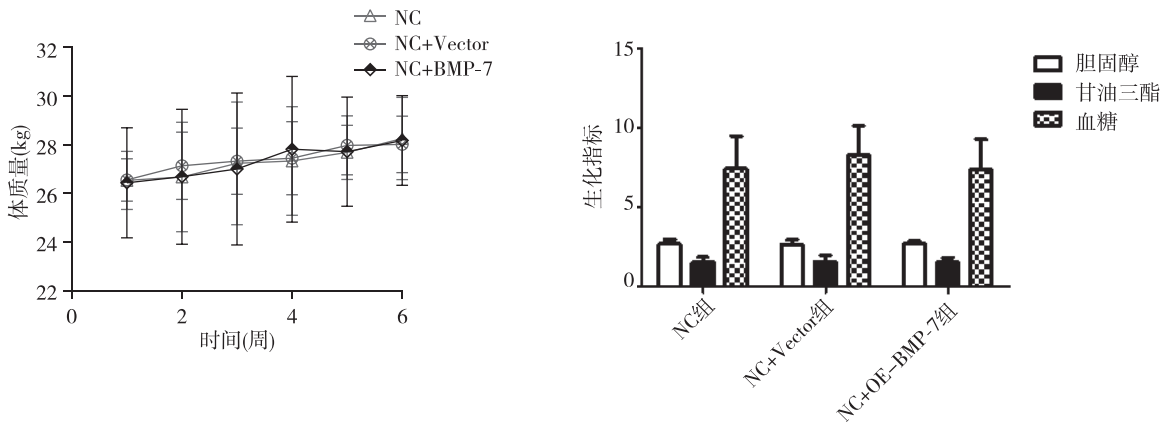


图 2 各组小鼠胆固醇、甘油三酯及血糖水平

Fig. 2 Levels of weight, cholesterol, triglyceride, blood glucose in each group

2.2 肝脏和肾脏组织形态学

NC 组小鼠肝组织排列整齐,与 NC 组比较,NC + Vector 组和 NC + BMP-7 组小鼠肝组织无明显形态学变化。NC 组小鼠肾组织肾小球形态结构完整,肾小管未见坏死和扩张,与 NC 组比较,NC + Vector 组和 NC + BMP-7 组小鼠肾小球及肾小管无明显受损表现,见图 3。

2.3 肝组织中 AST 和 ALT 的活力

与 NC 组相比,NC + Vector 组和 NC + BMP-7

组小鼠肝组织中 AST 和 ALT 的活力无明显增高,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组小鼠肝组织中 AST 和 ALT 的活力
Tab.1 Levels of AST and ALT in each group

分组	活力 (U/gprot)	
	AST	ALT
NC 组	29.17 ± 2.48	181.43 ± 19.16
NC + Vector 组	30.31 ± 3.37	183.91 ± 28.47
NC + BMP-7 组	30.17 ± 1.35	183.43 ± 26.92

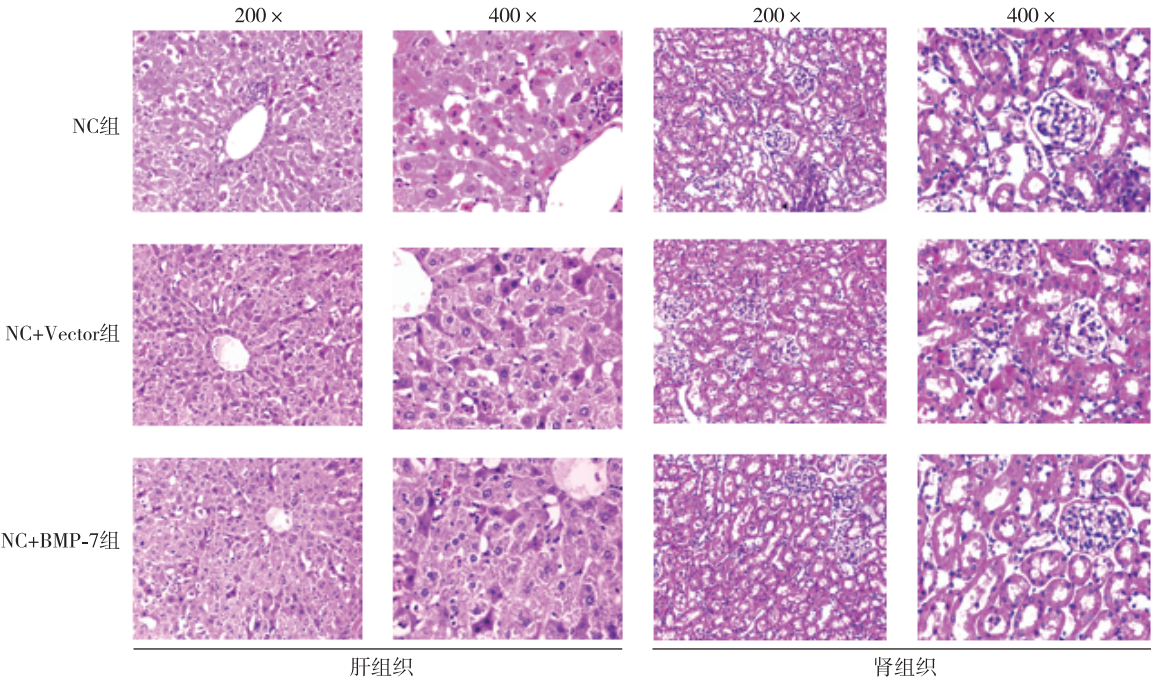


图 3 各组小鼠肝、肾组织形态学

Fig. 3 Histological change of livers and kidneys in each group mice

2.4 心脏、肝脏、肺脏和肾脏组织中 BMP-7 的表达

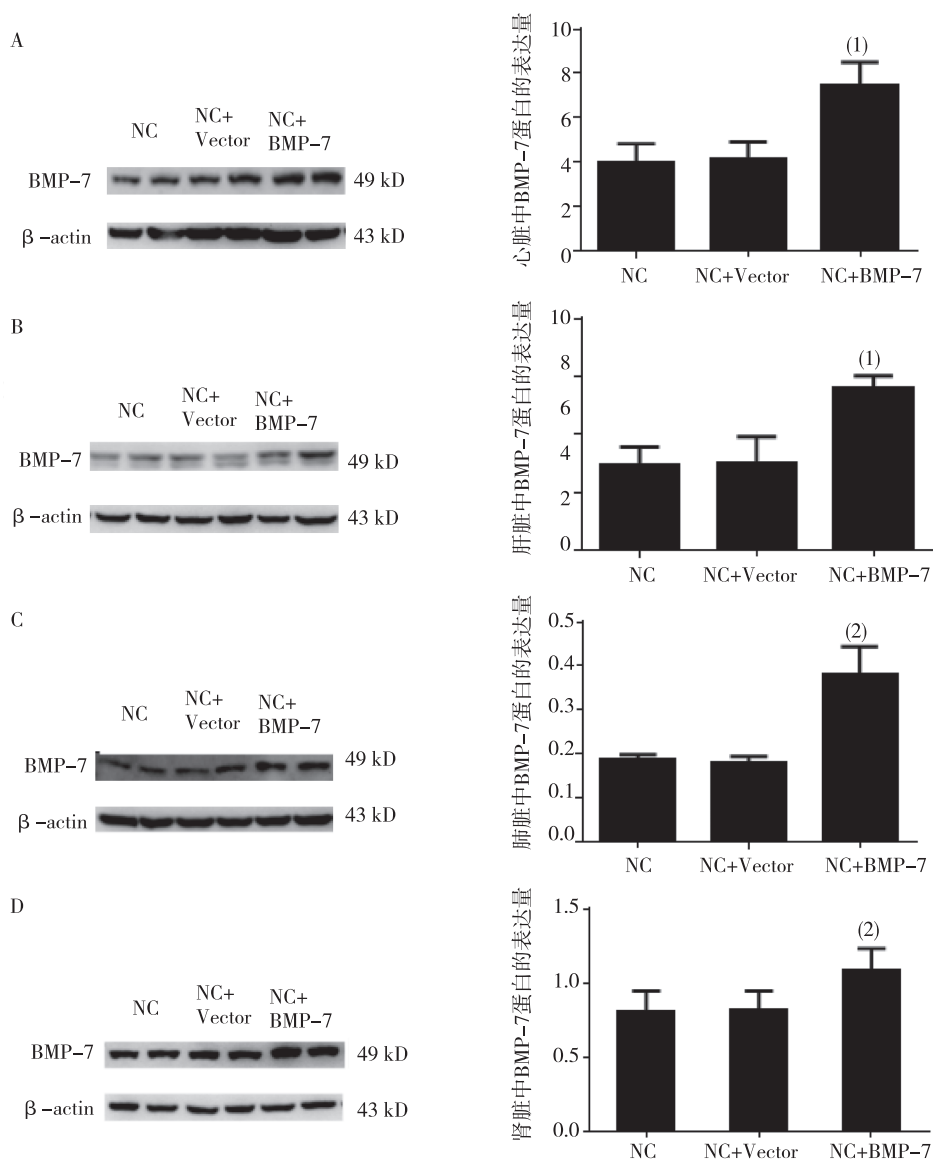
与 NC 组相比,NC + Vector 组小鼠心、肝、肺和肾脏组织中 BMP-7 蛋白表达无明显差异 ($P > 0.05$),NC + BMP-7 组小鼠心、肝、肺和肾脏组织中 BMP-7 的蛋白表达水平明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4。

3 讨论

尾静脉注射质粒这种新型的基因治疗技术目前还未得到广泛传播,但是其与单纯的基因动物比较仍具有很大的优势^[5]。在基础研究中,通过人为设定注射质粒的时间和量可以在动物疾病发生的任意时间给予不同程度的基因治疗,而不是让动物出生后就带有目的基因表达的改变,这样可以更好调控实验中的变量^[6]。同时,尾静脉注射质粒,与基因动物比较,成本相对较低。通过尾静脉注射质粒不仅可以制备抗体,还能用于多种疾病的治疗,甚至包括肿瘤的治疗^[7-10]。目前这种试验方法也收到越来越多试验人员的认可^[11-12]。

李晓敏等^[13]发现,尾静脉注射 2.5 ~ 16 μg IL-12 质粒,最高表达量出现在 16 μg 组,说明注射质

粒的量越大,质粒在体内表达得越多,因此本实验采用注射 15 μg 质粒进行研究。有研究报道,将质粒溶解于林格液时基因表达量最高,这可能跟氯化钙 (CaCl_2) 能使质粒更易进入细胞有关,并且这种溶媒对肝脏的毒性作用最小^[14]。Feng D 等^[15]还发现,当动物处于麻醉状态时,进行质粒注射有利于转基因的表达。本实验中,戊巴比妥钠按 65 mg/kg 剂量腹腔注射,麻醉作用起效时间在给药 5 ~ 10 min 后,可使小鼠麻醉约 2 h。在麻醉过程中要注意小鼠的个体性差异,有少数小鼠需要补充麻醉药剂量。在注射质粒的初期,参考文献^[8]给予小鼠注射 2 mL 质粒溶液,发现小鼠容易发生急性心衰死亡,这可能跟小鼠的全身血容量占体质量的 6% 有关,所以后期将质粒溶液减少到安全剂量 0.2 mL。当尾静脉注射完毕后,需将小鼠单独放置在鼠笼,切勿堆挤,以免造成窒息死亡。尾静脉注射 BMP-7 过表达质粒可以实现 BMP-7 在小鼠主要脏器心、肝、肺和肾脏中的高表达。有研究表明,通过注射 BMP-7 质粒可以治疗糖尿病肾病^[16]。Xuan Bu 等^[17]通过注射 HGF 质粒治疗小鼠的肾小管足细胞损伤。有研究报导,这种水流动力学注射的方法虽然在 1 周内对小鼠肝脏有轻微损伤作用^[18],但是小鼠肝脏组织可以自然修复^[19-20]。为



注:A、B、C、D 分别为 BMP-7 在心脏、肝脏、肺脏及肾脏中的表达水平;与 NC 组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.01$, ⁽²⁾ $P < 0.05$

图 4 各组小鼠心脏、肝脏、肺脏和肾脏组织中 BMP-7 表达

Fig. 4 The protein expression of BMP-7 in heart,liver,lung and kidney tissues in each group

此,本研究检测了各组小鼠肝组织中 AST 和 ALT 的表达,而各组之间无明显差异,且尾静脉注射 BMP-7 过表达质粒可以实现 BMP-7 在小鼠主要脏器的高表达。提示通过每周 1 次尾静脉注射过表达质粒,可实现目的基因在主要脏器的高表达,且不影响肝脏的功能。所以,通过尾静脉注射质粒这种高效安全的方法可以为今后基因治疗方法开辟一条新的道路。

4 参考文献

[1] MANSON S R,AUSTIN P F,GUO Q,et al. BMP-7 signa-
1196

ling and its critical roles in kidney development,the responses to renal injury,and chronic kidney disease[J]. Elsevier,2015,99:91-144.

[2] MIYAZONO K,KAMIYA Y,MORIKAWA M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction[J]. The Journal of Biochemistry, 2010,147(1):35-51.
[3] 李晓帆,李乃龙,张海英,等. 水流动力学注射 PD-L1 质粒在骨髓预处理小鼠移植模型中的表达[J]. 中国实验血液学杂志, 2015,23(5):1432-1437.
[4] KOHJI K,YUJI L,KOHJI O,et al. Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats[J]. Liver Fibrosis, 2007,56,706-714.
[5] XIANG L. Effects of leptin gene expression in mice in vi-

- vo by electroporation and hydrodynamics-based gene delivery[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003,307(3): 440-445.
- [6] ZHANG G, GAO X, SONG Y, et al. Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery[J]. *Gene Therapy*, 2004,11(8):675-682.
- [7] 袁艳军,王艳鸽,刘峰涛,等. 水流动力学方法进行基因免疫制备高效价抗体[J]. *现代免疫学*, 2009,29(5): 401-404.
- [8] 王健君,李艳茹,李晓敏,等. 水流动力学注射介导的 IL-12 基因对小鼠恶性腹水的治疗作用[J]. *吉林大学学报:医学版*, 2008,34(2):179-182.
- [9] KAMIMURA K, YOKOO T, ABE H, et al. Image-guided hydrodynamic gene delivery: current status and future directions [J]. *Pharmaceutics*, 2015,7(3):213-223.
- [10] 朱喆. 静脉注射编码 IL-2 和 IL-12 的质粒抑制小鼠肿瘤形成[D]. 长春:吉林大学, 2010.
- [11] GAO M, MA Y, CUI R, LIU D. Hydrodynamic delivery of FGF21 gene alleviates obesity and fatty liver in mice fed a high-fat diet[J]. *Journal of Controlled Release: Official Journal of The Controlled Release Society*, 2014(185):1-11.
- [12] YAZAWA H. Hydrodynamics-based gene delivery of naked DNA encoding fetal liver kinase-1 gene effectively suppresses the growth of pre-existing tumors[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2006,13:993.
- [13] 李晓敏,李艳茹,张海英,等. 水流动力学注射介导的 IL-12 基因在小鼠体内的高效表达[J]. *中国免疫学杂志*, 2007,23:1064-1068.
- [14] 李晓敏,王健君,李艳茹,等. 水流动力学注射 - 一种新型的体内基因转移技术[J]. *中国实验诊断学*, 2007,11(2):275-277.
- [15] FENG D, HE C, MIAO C, et al. Conditions affecting hydrodynamics-based gene delivery into mouse liver *in vivo* [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004,31:850.
- [16] SHINONG W, MARK D C, JEFFREY K, et al. Renal bone morphogenetic protein-7 protects against diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17: 2504-2512.
- [17] BU X, ZHOU Y, ZHANG H, et al. Systemic administration of naked plasmid encoding HGF attenuates puromycin aminonucleoside-induced damage of murine glomerular podocytes [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 20(301):784-792.
- [18] KAMIMURA K, KANEFUJI T, YOKOO T, et al. Safety assessment of liver-targeted hydrodynamic gene delivery in dogs [J]. *Mori K ed PLoS ONE*, 2014, 9(9): e107203.
- [19] 李胜男,张海英,孙千惠,等. 水流动力学注射对小鼠肝损伤及肝脏的自然修复作用[J]. *吉林大学学报:医学版*, 2018,44(2):275-281.
- [20] 李胜男. 水流动力学注射性肝损伤模型的建立及其修复过程中相关因子的检测[D]. 长春:吉林大学, 2014.

(2018-07-11 收稿,2018-09-15 修回)
中文编辑: 文箫颖; 英文编辑: 冉海勇