

骨形成蛋白对小鼠造血型急性放射损伤治疗作用的研究

田 琼¹ 张绍章¹ 蒲 勤² 张发科¹ Hannah X. H.³

¹(第四军医大学基础部教学实验中心 西安 710032)

²(第四军医大学生化教研室 西安 710032)

³(香港科技大学生物化学系 香港九龙清水湾)

摘要 小鼠经⁶⁰Co γ 射线 6.5—7.5Gy 照射后,分别于肌袋内植入纯化牛 BMP,或腹腔内注入可溶性 rhBMP-2m,或移植 Pbk-hBMP-2/NIH3T3 入腹腔内,观察动物的 30d 活存情况,并检测几种造血参数。结果表明,pbBMP(纯化牛骨形成蛋白)、hBMP-2m(重组骨形成蛋白-2 多肽) Pbk-BMP-2/NIH3T3 cell line(PBK hBMP-2 转基因细胞株)对小鼠 6.5、7.0、7.5Gy γ 射线照射后急性放射造血损伤有治疗作用:GM-CFU 集落形成率、各项造血参数和 30d 活存率均较对照组有显著性差异($p < 0.01$)。本工作结果提示,BMP 对成年动物放射所致造血损伤具有治疗作用,其机理与促进已损伤的造血功能的修复作用有关。

关键词 BMP, 放射损伤, 造血修复

中图分类号 R683

文献[1]报道,用纯化的牛骨形成蛋白(BMP)植入异种动物的肌袋内,可以诱导间质细胞分化形成新的软骨和骨。文献[2,3]利用基因工程的方法得到重组的 rhBMPs,并发现在骨和软骨形成同时,也形成新的骨髓^[4,5]。国内外对 BMP 的研究很多,尤其在骨缺损的研究方面^[6,7]已经使用于临床^[8]。本工作主要侧重于 BMP 对急性放射病造血损伤的治疗作用的研究,为急性放射病的治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 EcoR I, BamH I 限制性核酸内切酶购自原平公司。T4DNA 连接酶购自华美公司。Liperfectin, G418 购自东方公司。pbBMP 从本校口腔医学院杨连甲教授处购得。分子量 8000 \pm 500。rhBMP-2m 由工程菌 Ecoli 表达制备的 114 个氨基酸组成的 hBMP-2 成熟肽。该药系冻干品,可溶解于生理盐水,临用时新鲜配制成 4.0g/L。

1.1.2 Pbk-hBMP-2/NIH3T3 细胞株 pUB2m 和 PBK 载体 EcoR I, Sal I 酶切后以 T4 DNA 连接酶连接,Liperfectin 介导转染入 NIH3T3 细胞内,G418 筛选,培养。

1.1.3 动物 BALB/c 雄性小鼠 257 只,体重 19—21g,70—80d,自由进水进食。

1.1.4 照射条件 动物置于弧形塑料盒内接受⁶⁰Co γ 射线源 6.5、7.0、7.5Gy 全身照射。照射剂量率 0.96Gy/min。

国家自然科学基金(39970231)资助

第一作者:田琼,女,1952年1月出生,1989年获得第四军医大学放射生物化学专业硕士学位,副教授

收稿日期:初稿 2000-11-02, 修回 2001-02-13

1.2 方法

1.2.1 动物分组 257 只小鼠随机分为 5 个实验组。

1.2.2 纯化牛骨形成蛋白对 CFU-GM 集落形成的影响 80 只 BALA/c 小鼠随机分为 4 组, 每组 20 只; 对照、照射、BMP、照射+BMP。小鼠经 6.5Gy 照射后 1d, 将 pbBMP 5mg 植入小鼠股部肌间隙内, 手术后 10d 和 20d 各处死 5 只小鼠, 取骨髓测定 CFU-GM 集落产率。

1.2.3 不同剂量重组人 BMP-2m 对 BALA/c 小鼠 7.5Gy 照射后 30d 活存率的影响 80 只 BALB/c 小鼠随机分为 4 组, 每组 20 只; 照射对照、治疗 1、治疗 2、治疗 3 共有 4 组。照射后 1-6d, 治疗 1、治疗 2、治疗 3 组每只小鼠分别腹腔注入(ip)rhBMP-2m 0.5、1.0、和 2.0mg, 对照小鼠 ip 等量生理盐水, 照射后 30d 内每日记录动物死亡情况, 计算 30d 动物活存率和死亡动物平均活存天数。

1.2.4 rhBMP-2m 治疗 6.5Gy γ 射线照射后 BALA/c 小鼠几种造血参数的变化情况 24 只 BALA/c 小鼠随机可分为 4 组: 对照、rhBMP-2m、照射、照射+rhBMP-2m 4 个组。照射后 1-6d, 将 rhBMP-2m 2.0 mg 溶于 0.5mL 生理盐水中腹腔注入, 每日 2.0mg 共 6d, 照射后 9d, 取血查外周血中 WBC 数, 后处死动物, 取出小鼠股骨, 用 1640 培养液冲出细胞, 检测骨髓细胞总数, 并用过氯酸进行消化, 然后吸取上清, 紫外分光光度计测定其 DNA 含量; 用双层琼脂培养法测定 CFU-GM 集落形成能力, 取脾脏称重, 计算脾体比(脾脏与体重之比), 并浸泡在 Bouin's 液体中 24h, 观察脾结节形成率。

1.2.5 Pbk-hBMP-2/NIH3T3 转基因细胞移植对 7.0Gy 照射后 BALB/c 小鼠 30d 活存的影响 BALB/c 小鼠 20 只, 随机分为阴性对照组和治疗组, 照射后 1d 和 3d 各移植细胞 1 次, 治疗组小鼠每只每次 ip Pbl-hBMP-2/NIH3T3 转基因细胞 1mL, 含细胞 1×10^7 个; 阴性对照组每只小鼠 ip 等量空载体转染的 NIH3T3 细胞。照射后 30d 内, 每日记录动物死亡情况, 计算 30 d 活存率和死亡动物平均活存天数。

1.2.6 Pbk-hBMP-2/NIH3T3 转基因细胞移植对 6.5Gy 照射后 BALB/c 小鼠造血组织的保护作用 BALB/c 小鼠 53 只, 随机分为对照、照射、治疗和阴性对照 4 组, 照射后 1d 和 3d, 治疗组和阴性对照组按 1.2.5 方法分别移植转基因细胞和空载体转染的 NIH3T3 细胞。照射后 9d, 检测有关造血指标, 方法同实验 3。

1.3 统计处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 显著性差异采用卡方检验或小样本 t 检验。

2 结果

(1) pbBMP(纯化牛骨形成蛋白)对 CFU-GM 集落形成的影响结果见表 1。

Tab.1 The number of CFU-GM colonies in mouse bone marrow ($n=10$)

Group	10 th day irradiation	20 th day after irradiation
Control	40.0 \pm 20.4	49.0 \pm 10.2
pbBMP	20.0 \pm 6.5	97.0 \pm 14.3 ⁽²⁾
Irradiation	1.0 \pm 0.2	34.6 \pm 11.5
Irradiation + pbBMP	25.0 \pm 11.3 ⁽¹⁾	45.8 \pm 9.3

⁽¹⁾ $p < 0.05$, vs irradiation group, ⁽²⁾ $p < 0.01$, vs control group

(2) 不同剂量重组人 BMP-2m 对 BALA/c 小鼠 7.5Gy 照射后 30d 活存率的影响见表 2。

Tab.2 Effect of different doses of rhBMP-2m on the survival of mice on the 30th day after irradiation (n=20)

Group	rhBMP-2m dose/mg·mouse ⁻¹	Number of survival	Survival rate/%	Time/d
Irradiation	0.0	0	0	9.5±3.3
Treatment 1	0.5	2	10	8.5±3.4
Treatment 2	1.0	3	15	11.8±4.3
Treatment 3	2.0	7	35 ⁽¹⁾	13.2±4.7

⁽¹⁾ p < 0.01 vs irradiation

(3) rhBMP-2m 对 6.5Gy γ 射线照射后 BALA/c 小鼠几种造血参数的变化结果见表 3、表 4。

Tab.3 Effect of rhBMP-2m on the mouse bone marrow cells after irradiation (n=6)

Group	No. of bone marrow cells/×10 ⁹	DNA content of bone marrow cells/0.0	No. of CFU-GM colomies×10 ² /femur
Control	12.99±1.26	0.7346±0.002	48.20±0.16
rhBMP-2m	10.89±1.03	0.7477±0.002	97.19±0.27
Irradiation	2.23±0.04	0.4509±0.001	11.20±0.03
Irradiation+rhBMP-2m	9.86±1.07 ⁽¹⁾	0.6720±0.001	80.03±0.22 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ p < 0.01 vs irradiation

Tab.4 Effect of rhBMP-2m on the some other mouse hematological parameters after irradiation (n=6)

Group	WBC count/10 ⁹ . L ⁻¹	Spleen weight/body weight	Spleen colony /10·L ⁻¹
Control	16.33±0.10	0.0065±0.0002	-----
rhBMP-2m	14.92±0.05	0.0120±0.0002	-----
Irradiation	2.08±0.01	0.0028±0.0001	0.4±0.1
Irradiation+rhBMP-2m	12.17±0.04 ⁽¹⁾	0.0074±0.0001 ⁽¹⁾	4.7±0.3 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ p < 0.01 vs irradiation

(4) Pbk-hBMP-2/NIH3T3 转基因细胞移植对受 7.0Gy 照射后 BALB/c 小鼠 30d 活存率的影响在对受 7.0 Gy 照射后 BALB/c 小鼠 30d 活存的观察中,用 hBMP-2 cDNA 转染的 NIH3T3 细胞基因治疗的小鼠 30d 活存率非常显著提高(p < 0.01),并延长了活存时间,结果见表 5。

Tab.5 Effect of transfection of NIH3T3 cells with pbk-hBMP-2 cDNA on the survival of mice on the 30d after 7.0Gy γ irradiation (n=10)

Group	Number of survival rate	Survival rate/%	Mean survival time/d
Negative control	2	20	14.5 ± 9.0
Treatment	8	80 ⁽¹⁾	16.0 ± 9.9

⁽¹⁾ p < 0.01 vs irradiation

(5) Pbk-hBMP-2/NIH3T3 转基因细胞移植对 6.5Gy 照射后 BALB/c 小鼠造血组织的保护作用结果见表 6 和表 7。

Tab.6 Effect of transfection of NIH3T3 cells with hBMP-2 cDNA on the mouse bone marrow cells on the 9th day after 6.5Gy γ irradiation

Group	N	No. of bone marrow/ $\times 10^{-9}$	DNA content of bone marrow cells/O·D	CFU-GM count $\times 10^2$ /femur
Control	15	16.65 \pm 3.23	0.8250 \pm 0.1557	170.0 \pm 63.8
Radiation	15	1.09 \pm 0.84	0.1540 \pm 0.0520	0.9 \pm 0.8
Negative control	10	0.97 \pm 0.58	0.1179 \pm 0.0117	0.3 \pm 0.4
Treatment	13	4.30 \pm 3.10 ⁽¹⁾	0.8086 \pm 0.3503 ⁽¹⁾	8.1 \pm 7.5 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $p < 0.01$ vs. negative contro

Tab.7 Effect of transfecting of NIH3T3 cells with hBMP-2 cDNA on some mouse hematological parameters on the 9th day after 6.5Gy γ irradiation

Group	N	WBC count/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$	Spleen weight/body ratio	Spleen colony count
Control	15	16.70 \pm 0.70	0.0067 \pm 0.0013	-----
Radiation	15	2.53 \pm 1.60	0.0018 \pm 0.0002	0.6 \pm 0.2
Negative control	10	1.60 \pm 0.30	0.0022 \pm 0.0001	0.6 \pm 0.1
Treatment	13	4.20 \pm 1.30 ⁽¹⁾	0.0033 \pm 0.0001	1.2 \pm 0.8 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $p < 0.01$ vs. negative control

3 讨论

骨形成蛋白是 TGF- β 超家族成员之一,它与造血关系密切。它对胚胎期造血的作用已得到确切的证实。它能诱导胚胎期腹侧中胚层的发生,其结果是形成含有血细胞的“间质球”;以非洲爪蟾受精卵的发育为实验对象,当把 BMP-4 或 BMP-4-mRNA 微量注射入早期卵胚,能明显促使造血早期转录因子 GATA 的表达,血岛提前出现进而提前发育成为造血组织。相反,如微注射入 BMP 的反义核酸能阻止生理性 BMP 的合成,或导入编码有缺陷的 BMP 受体 mRNA,使缺陷受体竞争与 BMP 结合,取消 BMP 的作用,则 GATA 等基因表达受阻,血岛不能形成,造血系统发育障碍。这表明 BMP 的作用是决定胚胎细胞向造血细胞分化的关键^[9]。许多研究者^[10]都观察到 BMP 在诱导软骨和骨形成的过程中,BMP 植入部位血管侵入软骨,小淋巴样细胞聚集,围绕血管出现大量造血干细胞,这些干细胞繁殖、分化生成造血的骨髓。BMP 是在诱导骨形成的研究中被发现的,国内外对 BMP 诱骨研究的很多,而对其诱血的研究则很少。

实验中,用纯化的牛 BMP、rhBMP-2m 和 Pbk-hBMP-2/NIH3T3 转基因细胞分别对动物急性造血型放射病进行治疗和基因治疗,均得到有效的结果:小鼠在 6.5Gy γ 射线照射后第 10 天,植入纯化牛 BMP 的动物 CFU-GM 集落产率高于单纯照射组的动物($p < 0.05$),而

照射后第20天植入纯化牛BMP的动物CFU-GM集落产率仍高于单纯照射组的动物,但两组间结果无显著性差异。说明受到大剂量辐射损伤的动物,已经度过急期,造血系统已得到部分的修复,而植入体内的pbBMP由于逐渐被吸收活性降低;7.5Gy γ 射线照射后,未治疗的动物在10d内全部死亡,而用rhBMP-2m治疗的动物30d内活存35%,外周血、脾脏、骨髓、及粒-巨噬细胞集落形成的检查都显示治疗组动物造血系统的情况非常显著优于对照组动物;用hBMP-2 cDNA转染的NIH3T3细胞进行基因治疗的小鼠30d活存率从20%提高到80%,其它造血的指标也非常显著提高($p < 0.01$),并延长了活存时间。BMP从提取到基因表达产品,进而转基因细胞分泌用量越来越少,而由于所用BMP-2的纯度越来越高,所以对动物造血修复的结果越来越好。实验结果表明,BMP对成年动物的造血损伤具有诱生新的造血灶和修复损伤的功能。我们认为,这可能是成年动物造血受到损伤后,重现了BMP在胚胎期对造血的调控作用。文献[11]认为,BMP诱导间质细胞分化为骨、软骨和骨髓细胞^[11]。但这一过程是如何发生并转归的?尚无人定论。新生成的造血细胞是从间质细胞分化而来,还是从其它造血部位迁移而来?这些都需要进一步深入研究和探讨。

参 考 文 献

- 1 Urist M R, Lietze A, Mizutani H *et al.* Clin Orthop, 1982, **162**:219-232
- 2 Wozney J M, Rosen V, Celeste A J *et al.* Science, 1988, **242**(16):1528-1534
- 3 Jing An, Rosen V, Cox K *et al.* Exp Hematol, 1996, **24**(2): 768-775
- 4 Lind M, Eriksen E F, Bunger C. Bone, 1996, **18**(1):53-57
- 5 Jian Q Feng, Di chen, Austin J, Cooney *et al.* J Biol Chem, 1995, **270**(24):28364-28373
- 6 刘 玮,胡蕴玉,陆裕朴等. 中华医学杂志,1991, **71**(7):378-380
LIU W, HU Y Y, LU Y P *et al.* J Chin Med, 1991, **71**(7):378-380
- 7 高玉好,杨连甲. 国外医学口腔医学分册, 1995, **22**(3): 158-161
GAO Y H, YANG L J *et al.* Foreign Med Dental Fascicule, 1995, **22**(3):158-161
- 8 胡蕴玉,刘 玮,陆裕朴等. 中华外科杂志, 1993, **31**(12):709-713
HU Y Y, LIU W, LU Y P *et al.* J Chin Sur, 1993, **31**(12):709-713
- 9 Maeo M, Mead P E, Kelley C *et al.* Blood, 1996, **88**(6):1965-1972
- 10 Kenji K, Bessho K, Fujimira K *et al.* Br J Oral Maxillofac Surg, 1997, **35**(2):433-437
- 11 Kusumoto K, Bessho K, Fujimira K *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1995, 215-221

EFFECT OF BMPs ON HEMATOPOIETIC INJURY OF ACUTE RADIATION SICKNESS IN MICE

TIAN Qiong¹, ZHANG Shaozhang¹, PU Qin², ZHANG Fake¹, Hannah X. H.³

¹(Center of Teaching and Experiments, Fourth Military Medical University, Xian, 710032)

²(Hannah X H is at the Department of Biochemistry, Xian, 710032)

³(The university of Hong Kong Science and Technology, Clear Water Bay, Kowloon, Hong Kong.)

ABSTRACT To investigate the effect of bone morphogenetic proteins (BMPs) on the acute hematopoietic sickness induced in mice. BMP, rhBMP-2m and PBK/hBMP-2-NIH3T3 cells were prepared as previously described. In this study, the effect of BMPs on hematopoiesis included some hematological parameters. The survival ratio on the 30th d post irradiation and formation of bone marrow CFU-GM colonies were detected. The experiments indicate that pbBMP (purified bovine bone morphogenetic protein) could increase the formation of bone marrow CFU-GM colonies ($p < 0.05$) at 10th d after irradiation. rhBMP-2m increased the survival rate of mice irradiated by 7.5Gy. All mice in control group died in 30days, while 10%, 15% and 35% mice survived when they were injected ip with 0.5mg, 1.0mg and 2.0mg of rhBMP-2m respectively. All hematological parameters of treated mice were significantly higher than those of control group ($p < 0.01$). PBK/hBMP-2-NIH3T3 cells were established and transplanted into mice irradiated by 7.0Gy γ ray by i.p. The survival ratio of treated mice higher than that of negative control group ($p < 0.01$), and all hematopoietic parameters were increased statistically significantly ($p < 0.01$). These data supported our hypothesis: BMPs can be used for the treatment of the acute radiation sickness. The results indicated that in adult mice, BMPs could recover the hematopoietic injury from acute radiation sickness.

KEYWORDS Bbone morphogenetic proteins, Acute radiation sickness, Hematopoiesis

CLC R683