

大鼠肾小球足细胞的原代培养与鉴定*

陶于洪¹, 王亚妹¹, 彭文珍²

1. 四川大学华西第二医院 儿科(成都 610041); 2. 四川大学华西基础医学与法医学院
生物化学与分子生物学教研室(成都 610041)

【摘要】 目的 建立一种简单适用的原代培养与鉴定大鼠肾小球足细胞的方法。**方法** 通过差异过筛法收获 SD 大鼠(体质量 60~100 g)肾小球, 2 g/L IV 型胶原酶消化肾小球, 组织块种植法将肾小球种植于添加有 ITS-X (含转铁蛋白-亚硒酸钠-胰岛素)的 K1-3T3 培养基, 9~10 d 后首次传代培养。通过观察细胞形态结合免疫组织化学 SP 法检测角蛋白、结蛋白和 Wilms 瘤抑癌因子-1(WT-1)表达以鉴定足细胞。**结果** 种植肾小球 3 d 后, 可见从肾小球内生长出来的细胞逐渐增多, 9~10 d 后融合成鹅卵石样外观。传代后的细胞变为大而扁平的星形细胞, 有明显突起和微绒毛; 免疫组织化学法显示结蛋白表达呈阴性、角蛋白和 WT-1 表达呈阳性, 提示所培养的细胞为足细胞。**结论** 种植胶原酶消化的肾小球是一种简单易行的原代培养大鼠肾小球足细胞方法。WT-1 可作为鉴定大鼠肾小球足细胞的合适标记。

【关键词】 肾小球 足细胞 原代培养 大鼠 Wilms 瘤抑癌因子-1

Primary Culture and Identification of Rat Glomerular Podocytes TAO Yu-hong¹, WANG Ya-mei¹, PENG Wen-zhen². 1. Department of Pediatrics, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu, 610041, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China.

【Abstract】 Objective To establish an easy and feasible method for primary culture and identification of rat glomerular podocytes. **Methods** Glomeruli from Sprague-Dawley(SD) rats weighing 60-100 gram were isolated by the method of different size combination of screen. Isolated glomeruli were appropriately digested with 2 g/L type IV collagenase and cultured in 25 cm² plastic flask coated with rat tail collagen in K1-3T3 medium with ITS-X (containing insulin-transferrin-selenium). Subculture of primary cultured epithelial cells was performed at 9-10 days after implantation of collagenase digested glomeruli. Podocytes were identified by the morphology study with scanning electron microscope and inverted microscope, as well as the immunohistochemistry staining (SP methods) study for the expression of keratin, desmin and Wilms' tumor suppressor-1 (WT-1). **Results** Epithelial cells outgrowth from isolated glomeruli appeared after 3 days primary culture and grew to confluence with cobblestone-appearance at 9-10 days. These cobblestone cells were subcultured at this point and gradually conversed into large, flat arborized cells with well-developed processes and microvilli. These arborized cells were negative expression with desmin staining and showed positive expression of cytokeratin and WT-1, which indicated that they were podocytes. **Conclusion** Implantating collagenase digested-glomeruli is an easy and feasible method for primary culture of rat glomerular podocytes. WT-1 may serve as a good marker to identify rat glomerular podocytes.

【Key words】 Glomeruli Podocyte Primary culture Rat Wilms' tumor suppressor-1

足细胞不仅是肾小球疾病的被动受害者, 而且主动参与肾小球疾病的发生和发展。要从细胞分子水平研究足细胞生物学功能, 就必须体外培养足细胞。然而, 足细胞是高度分化的终末细胞, 体外培养很困难。随着基因敲除、RNA 干扰技术的发展, 国外已建立人^[1]和 小鼠^[2]肾小球足细胞系。但是, 将

永生化基因插入足细胞基因组可导致足细胞表型出现一定差异, 足细胞特异性基因转录水平在足细胞系表达较低, 体外分化的足细胞虽能伸出突起, 但其是否为真正意义上的足突以及突起之间是否能形成具有生物学功能的裂孔隔膜均不明确^[3]; 而原代培养的足细胞生物学特性更接近体内足细胞的生物学特性^[4]。本研究旨在建立一种简单适用的原代培养和鉴定大鼠肾小球足细胞方法, 为研究足细胞生物

* 国家自然科学基金(No. 30700775)资助

学功能奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞株

一级SD大鼠,雄性,体质量60~100 g〔四川大学实验动物中心、生产许可证SCXK(川)-10-2006〕。NIH/3T3细胞(四川大学华西基础医学与法医学院医学分子生物学实验室)。

1.2 主要仪器和试剂

倒置显微镜(日本OLYMPUS),扫描电镜(日本JSM-5900LU型)。100目、150目和300目不锈钢筛网(市售)。ITS-X(含转铁蛋白0.55 g/L、亚硒酸钠67 mg/L、胰岛素1 g/L,美国Gibco公司),DMEM和DMEM/F12培养基(成都哈里生物工程公司)。大鼠抗人、兔、大鼠、小鼠角蛋白多克隆抗体,大鼠抗人、兔、大鼠结蛋白多克隆抗体,均来自武汉博士德生物工程有限公司。兔抗人、大鼠和小鼠Wilms瘤抑癌因子-1(WT-1)多克隆抗体(美国Santa Cruz公司)。

1.3 制备K1-3T3培养基

K1培养基成分有DMEM/F12培养基,含4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)10 mmol/L、ITS-X、青霉素 10^5 U/L、链霉素100 mg/L。3T3培养基成分有DMEM培养基(高糖型),含200 g/L胎牛血清、HEPES 10 mmol/L、谷氨酰胺2 mmol/L、丙酮酸钠2 mmol/L、青霉素 10^5 U/L、链霉素100 mg/L。常规培养NIH/3T3细胞,待30%~50%细胞融合时,改在3T3培养基中培养24 h,3 500 r/min离心10 min,收集培养上清,过滤,-70℃保存。1:1体积比混合K1培养基和NIH/3T3细胞培养上清,即为K1-3T3培养基。

1.4 制备鼠尾胶原

取出体质量400~500 g SD大鼠鼠尾尾腱,按每1 g尾腱加入1 mL/L醋酸50 mL比例,4℃软化1周。2 000 r/min离心15 min,取上清,-20℃保存。

1.5 差异过筛法分离肾小球

颈椎脱臼法处死SD大鼠。在无菌条件下,取出双肾,置于预冷DMEM培养基。去除肾包膜,剪碎肾皮质。在150目筛网上,10 mL注射器针芯轻轻碾压肾皮质,不时用磷酸盐缓冲液冲洗,收集过筛悬液。在100目和300目筛网上,依次过滤细胞悬液,收集300目筛网上的肾小球。在倒置显微镜下观察肾小球形态。

1.6 消化及种植肾小球

2 g/L IV型胶原酶37℃适当消化肾小球15 min左右。在倒置显微镜下观察,见肾小球内有少许细胞游离时加含100 g/L新生小牛血清的DMEM培养基终止消化。1 000 r/min离心10 min离心洗涤两次,K1-3T3培养基重悬肾小球。以适当密度种植在铺有鼠尾胶原的25 cm²塑料培养瓶中,37℃、50 mL/L CO₂培养。

1.7 足细胞纯化与传代

种植肾小球后,静置3 d,4 d后开始首次换液,以后每2 d换液1次。种植肾小球后第9~10 d,采用2.5 g/L胰蛋白酶(含0.2 g/L乙二胺四乙酸)消化传代培养足细胞。视生长情况5~7 d传代1次。

1.8 大鼠肾小球足细胞鉴定

1.8.1 形态学观察 第1次传代培养足细胞后3 d,苏木精-伊红染色(HE染色),观察细胞形态;25 g/L戊二醛固定细胞,10 mL/L锇酸溶液后固定2 h,梯度脱水,放入100%醋酸戊酯中10 min。临界点干燥样品,离子溅射,扫描电镜下观察细胞形态。

1.8.2 免疫组织化学SP法染色 取第2次传代的细胞。40 g/L多聚甲醛固定足细胞,1 mL/L曲拉通X-100(Triton X-100)破膜,小牛血清封闭,分别滴加角蛋白(1:200)、结蛋白(1:200)或WT-1(1:100)等多克隆抗体4℃过夜,阴性对照仅加抗体稀释液。滴加相应的生物素化二抗37℃孵育1 h,角蛋白和结蛋白滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液或WT-1滴加碱性磷酸酶标记链霉卵白素工作液,37℃孵育30 min,显色,封片。

2 结果

2.1 肾小球分离

从大鼠肾皮质分离出来的肾小球呈球形,受到研磨等机械刺激,多数肾小球脱去壁层肾小囊,肾小球内细胞折光性好(图1A)。经血球计数板计数,每只大鼠提取的肾小球数量为 1.5×10^4 个左右,纯度95%以上。

2.2 肾小球培养和形态学观察

在种植肾小球后第3 d,80%~90%肾小球贴壁,逐渐有多形性细胞从肾小球四周移出;在种植肾小球后第5 d,在贴壁肾小球周围,细胞数量明显增多,体积较小,为多边形,无突起伸出,细胞分裂相易见,部分足细胞生长至融合,紧密排列呈鹅卵石样外观;在种植肾小球第9~10 d后,肾小球变小、消失,

多数视野足细胞已连成片(图 1B)。第 1 次传代 3 d 后的足细胞呈星形的树枝状细胞,体积逐渐变大,有明显突起(图 2A),相邻足细胞突起可相互交叉形成连接,胞核较大呈圆形或椭圆形,以单个核多见;扫描电镜观察可见细胞表面少许微绒毛和突起(图

2B)。第 3 次传代后,细胞不再生长。

2.3 免疫组织化学 SP 法染色

所有细胞均为角蛋白阳性(图 3A)、结蛋白阴性(图 3B),符合上皮细胞特征;WT-1 分布在细胞核和核周,提示所有收获的细胞均为足细胞(图 3C)。

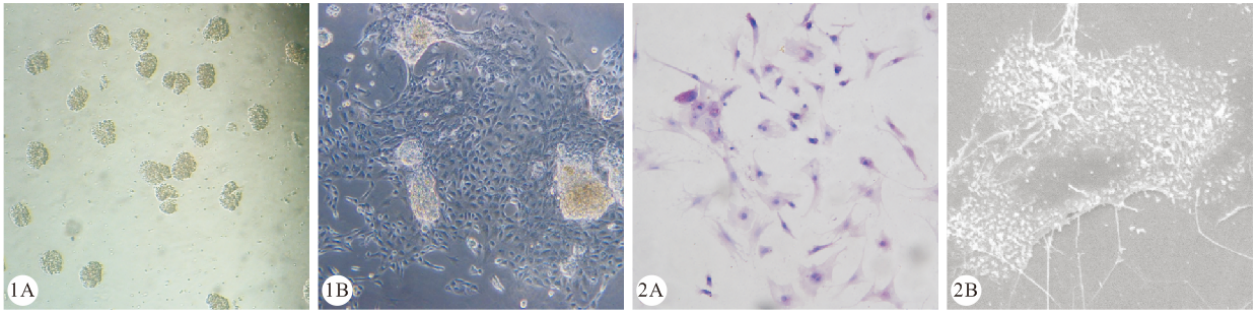


图 1 肾小球接种前和接种后 9 d 形态学观察 图 2 第 1 次传代后 3 d 足细胞形态
Fig 1 Morphology observation of glomeruli before implantation and at 9 days after implantation Fig 2 Morphology observation of epithelial cells at 3 days of subculture

1A: Isolated collagenase-digested glomeruli before implantation (×200); 1B: Epithelial cell outgrowth after 9 days of primary culture (×200); 2A: HE staining (×200); 2B: Scanning electron microscope (×2 000)

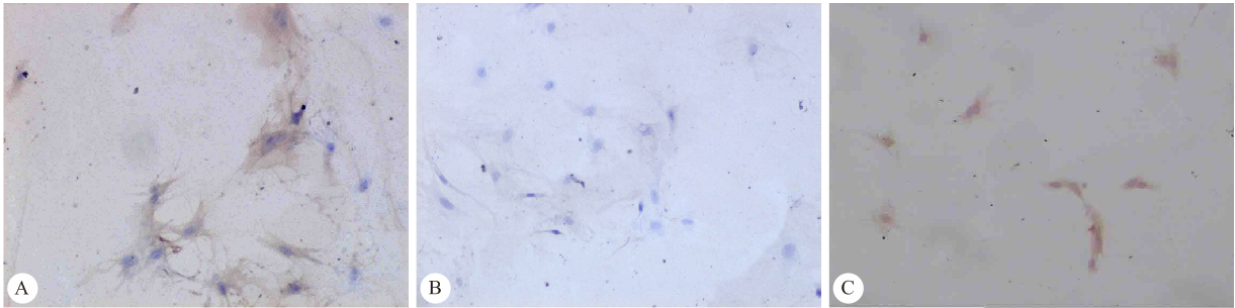


图 3 培养的上皮细胞中角蛋白(A)、结蛋白(B)和 WT-1(C)的表达。SP ×200
Fig 3 Immunohistochemistry staining of keratin (A), desmin (B) and WT-1 (C) on epithelial cells. SP ×200

3 讨论

肾小球必须附着在适宜底物上才能让足细胞生长。因此,原代培养足细胞要求肾小球必须尽早尽量贴壁。本研究肾小球贴壁率(80%~90%肾小球贴壁)高于国外文献报道,如 Katsuya 等^[4]培养足细胞时仅 40%~60%肾小球贴壁。要提高肾小球贴壁率,需要考虑以下几个方面。首先,选择合适的培养瓶。足细胞是锚固细胞,需在培养瓶表面覆盖一层非收缩性胶原凝胶才能促进肾小球贴壁。因此,多在培养瓶表面铺上鼠尾胶原。鼠尾胶原的厚薄和酸碱度将影响肾小球贴壁率和足细胞生长。鼠尾胶原的厚度尽量要薄,最好在使用前加入 DMEM 培养基 37 ℃ 孵育 24 h,DMEM 培养基 pH 值在 7.4 左右时,才开始种植肾小球。其次,选择合适的培养基和血清浓度。培养足细胞最常用的培养基是

RPMI-1640 培养基或 DMEM 培养基,血清浓度较低或无血清。也有报道采用特殊培养基,如 K1-3T3 培养基^[5],K1 包含前列腺素 E1、转铁蛋白、胰岛素、甲状腺素和氢化可的松,3T3 为小鼠成纤维细胞的培养上清。本研究采用的是改良的 K1-3T3 培养基,即含有胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸钠,而无前列腺素 E1、甲状腺素和氢化可的松,该混合培养基能很好促进足细胞生长。第三,适当消化肾小球。分离的肾小球可以直接种植到培养瓶中,等待细胞从肾小球中爬出来,但是肾小球不易贴壁,贴壁高峰在 2 周左右。现在多先采用胶原酶、胰酶或脱氧核糖核酸酶消化肾小球^[6]。过度消化肾小球不但可以使肾小球内细胞受到过度刺激而不易贴壁和细胞活性下降,而且过度消化以后残留在肾小球中的细胞多为系膜细胞^[7]。相对于胰酶和脱氧核糖核酸酶,胶原酶对组织细胞的损伤较小。因此,本研究采用

胶原酶消化肾小球。值得注意的是,不同类型、不同厂家的胶原酶消化肾小球的效能有一些差异,每次更换厂家时,需要摸索消化时间。为了防止过度消化肾小球,Katsuya 等^[4]提出应用免疫磁珠法分离肾小球,并认为此方法较酶消化所得肾小球和足细胞纯度要高。本研究采用的差异过筛法结合胶原酶消化肾小球较免疫磁珠法简单、经济和方便。胶原酶消化肾小球以少许细胞从肾小球内游离出来为度,该方法容易被掌握。第四,组织块种植法可促进肾小球贴壁。在第一次重悬消化后的肾小球时,种植肾小球的密度要适当,加入 K1-3T3 培养基的容量以刚能铺满培养瓶底面为宜,在种植肾小球后,开始的 3 d 内不要摇动培养瓶以免影响肾小球贴壁;首次换液时,动作要轻柔,要注意添加培养基的方向,以免将已经贴壁的肾小球冲走。此外,鼠龄过大、分离肾小球的时间过长和动作粗糙等也将影响肾小球贴壁率。在本研究中,为了增加肾小球贴壁,我们选择鼠龄较小的大鼠(60~100 g)、缩短操作时间和碾压动作轻柔(尤其是碾压肾皮质)。

为了获得均一、纯度较高的足细胞,除了选择合适的培养基和血清浓度,还要考虑足细胞和系膜细胞生长速度的差异,灵活掌握合适的首次传代时机。最先从肾小球爬出来的细胞为毛细血管内皮细胞,随后长出来的是足细胞,最后才是系膜细胞。由于内皮细胞需要特殊的血管内皮生长因子才能存活,在长出后 1~2 d 即很快死亡。有研究显示^[8],系膜细胞开始从肾小球爬出的时间约为第 7 d,培养 30 d 获得的细胞几乎均为系膜细胞。本研究在种植肾小球后 9~10 d 左右(细胞融合 70%~80%)时开始传代,所获细胞几乎均为足细胞。由此可见,在选择首次传代时机时,也不可固定在种植后第 7 d,要根据原代培养细胞生长速度而定。

从肾小球中爬出来的上皮细胞呈现 3 种形态。从无囊肾小球中爬出来的细胞与体内足细胞表型相同,为足细胞来源;在集落边缘的大的不规则细胞是壁层上皮细胞;对于呈多边形鹅卵石样细胞的来源存在争议^[9]。培养中的足细胞往往发生去分化^[10],足细胞可以呈增殖态和分化态。在大鼠足细胞系和 SV40 转化的人足细胞系中,增殖态细胞胞体较小,呈鹅卵石样;分化态细胞胞体为星形、胞体大,且有突起伸出。通过连续观察原代培养的人和大鼠的足细胞发现^[2, 4, 11],培养最初生长的鹅卵石样细胞在 2~3 周后可以转变为星形、有突起的树枝状细胞。本研究也显示,第一代足细胞在光镜下呈鹅卵石样形态;而传代后的细胞呈星形、有突起,在电镜下可

见微绒毛,与文献报道一致^[2, 4]。因此,仅仅依靠细胞形态学观察,难于鉴别所培养的细胞是否为肾小球足细胞;尚需要依赖于免疫组织化学染色检测足细胞标记。WT-1 是足细胞的特异性标记^[9]。WT-1 表达局限于肾小球足细胞,而在壁层上皮细胞和系膜细胞不表达。在大鼠足细胞系和 SV40 转化的人足细胞系中,增殖态与分化态细胞均在细胞核内特异性表达 WT-1^[1, 2]。因此,本研究采用 WT-1 作为鉴别足细胞的标记;结果显示,所培养的细胞 WT-1 与角蛋白表达阳性、结蛋白表达阴性,提示它们是肾小球足细胞。

综上所述,胶原酶消化肾小球结合组织块种植是一种简单易行的原代培养大鼠肾小球足细胞的方法。在培养过程中,足细胞可以呈增殖态和分化态等两种分化状态,仅靠细胞形态学难于确定所培养细胞是否为肾小球足细胞。WT-1 可作为鉴定大鼠肾小球足细胞的合适标记。

参 考 文 献

- 1 Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, *et al.* A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol*, 2002; 13(3): 630-638.
- 2 Mundel P, Reiser J, Zuniga MBA, *et al.* Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res*, 1997; 236(1): 248-258.
- 3 范青锋, 丁洁. 肾小球足细胞系的研究进展. *实用儿科临床杂志*, 2005; 20(1): 71-72.
- 4 Katsuya K, Yaoita E, Yoshida Y, *et al.* An improved method for primary culture of rat podocytes. *Kidney Int*, 2006; 69(11): 2101-2106.
- 5 Rops AL, der Vlag JV, Jacobs CW, *et al.* Isolation and characterization of conditionally immortalized mouse glomerular endothelial cell lines. *Kidney Int*, 2004; 66(6): 2193-2201.
- 6 Kreisberg JI, Hoover RL, Karnovsky MJ. Isolation and characterization of rat glomerular epithelial cells *in vitro*. *Kidney Int*, 1978; 14(1): 21-30.
- 7 Lovett DH, Ryan JL, Sterzel RB. Stimulation of rat mesangial cell proliferation by macrophage interleukin 1. *J Immunol*, 1983; 131(6): 2830-2836.
- 8 潘晓勤, 姜新猷. 肾小球系膜细胞培养及鉴定. *南京医科大学学报*, 1995; 15(1): 222-223.
- 9 Yaoita E, Yoshida Y. Polygonal epithelial cells in glomerular cell culture: podocyte or parietal epithelial origin. *Microsc Res Tech*, 2002; 57(4): 212-216.
- 10 Holthofer H, Sainio K, Miettinen A. Rat glomerular cells do not express podocytic markers when cultured *in vitro*. *Lab Invest*, 1991; 65(5): 548-557.
- 11 Shankland SJ, Pippin JW, Reiser J, *et al.* Podocytes in culture: past, present, and future. *Kidney Int*, 2007; 72(1): 26-36.

(2013-03-27 收稿, 2013-07-18 修回)

编辑 汤洁