文章编号:1000-5404(2010)23-2565-03

技术方法

大鼠足细胞的原代培养及鉴定

贾 苗,张益民,赖德源 (510120 广州,中山大学孙逸仙纪念医院肾内科)

【摘要】 目的 建立一种重复性好、操作简便的大鼠足细胞培养方法。方法 取体质量200~220 g的健康雌性SD大鼠,无菌取肾后通过差异过筛法分别通过80、150、200目细胞筛网,收集200目筛网上肾小球进行接种,利用植块法将接种培养面向上放置,4.5 h后将培养瓶翻转过来正常放置于37 ℃、5% CO_2的恒温恒湿培养箱进行孵育。采用形态学观察和细胞间接免疫荧光技术,对足细胞进行鉴定,并用流式细胞仪进行足细胞纯度分析。结果 5 d后可见绝大部分肾小球贴壁并有少许肾小球周围有细胞爬出,7~8 d可见所有肾小球周围有大量细胞爬出,胰酶消化后传代培养。形态学及特异性抗体WT-1、nephrin鉴定为足细胞。流式细胞仪分析细胞纯度99%左右。结论 差异过筛法分离大鼠肾小球,结合植块法促进肾小球贴壁,可简单、高效地培养出原代足细胞,且具备足细胞生物学特性,且在操作简单的情况下细胞产量、纯度与国外文献报道的相当。

【关键词】 足细胞;细胞原代培养;大鼠
【中图法分类号】 R329-33 **【文献标志码】** B

近年对肾小球疾病发病机制的深入研究发现足细胞损伤是导致其持续进展的关键[1],如微小病变肾病、局灶节段硬化肾病、膜性肾病和糖尿病肾病等。足细胞因为高度分化、结构复杂、定位特殊,体外培养的方法一直以来都受到学者的关注。国外已有实验室成功建立了人[2]、鼠[3]的条件永久性足细胞株,但所要求技术较高、花费较多,普遍应用有困难。本研究旨在建立一种简便可行、重复性好的大鼠肾小球足细胞的原代培养方法,为研究肾小球疾病的发病机制提供一个实验平台。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级SD大鼠,雌性,体质量200~220 g(中山大学实验动物中心),合格证号:0051349,使用许可证:SCXK(粤)2004-0011。

1.2 主要仪器与试剂

高级荧光分析倒置显微镜,流式细胞仪,80、150、200目不锈钢细胞筛网购自上海生工。DMEM/F12培养液、ITS、青-链霉素、FBS及0.25%胰酶-0.02% EDTA均购自GIBCO(美国)公司,兔抗大鼠nephrin、WT-1多克隆抗体(Abcam,美国),PI(碘化吡啶)和FITC标记抗兔IgG购自博士德公司。

1.3 大鼠肾小球足细胞原代培养

1.3.1 主要试剂的配制 含有5% FBS的完全培养基500 ml,内含有DMEM/F12培养液465 ml,FBS 25 ml,ITS 5 ml,青-链霉素5 ml。

1.3.2 大鼠肾小球的分离 采用差异过筛法[4-6]分离肾小球,并改进:①脱颈处死大鼠后,固定、消毒,沿腹部前正中线与脐水平线做十字切口,充分暴露肾脏后,剪下双侧肾脏,迅速放置于装有预冷DMEM/F12培养液的无菌离心管中,迅速移入超净台中,剥除完整肾包膜,用预冷的含有10%青-链霉素的PBS冲洗3次。②沿纵形长轴剖为两半,分离肾皮质在80目筛网剪碎成1~2 mm^3大小,用玻璃注射器针芯进行研磨至糜状,边研磨边用冷PBS冲洗,至糜状物颜色发白似纤维结缔组织,收集滤液分别通过150、200目筛网,收集200目筛网上的肾小球。上述操作均在冰盒上进行。

1.3.3 肾小球的接种和培养 将收集的肾小球离心5 min,1 500 r/min,加入完全培养基2 ml(2只大鼠)重悬,接种至3瓶75 cm^2培养瓶内,每瓶加入10 ml完全培养基,倒置培养瓶使接种面向上放入37 ℃、5% CO_2恒温恒湿培养箱内,孵育4.5 h后将培养瓶翻转过来使其正常放置。

1.3.4 足细胞消化、传代 肾小球接种第5天首次换液,7~8 d后进行消化,将消化下来的产物通过200目筛网以去除肾小球,收集过滤液离心5 min,1 500 r/min,完全培养基重悬,用血细胞计数板计数,按25 cm^2培养瓶 2.0×10^5/瓶,24孔板:3.0×10^4/孔的细胞密度接种,放入培养箱内孵育。

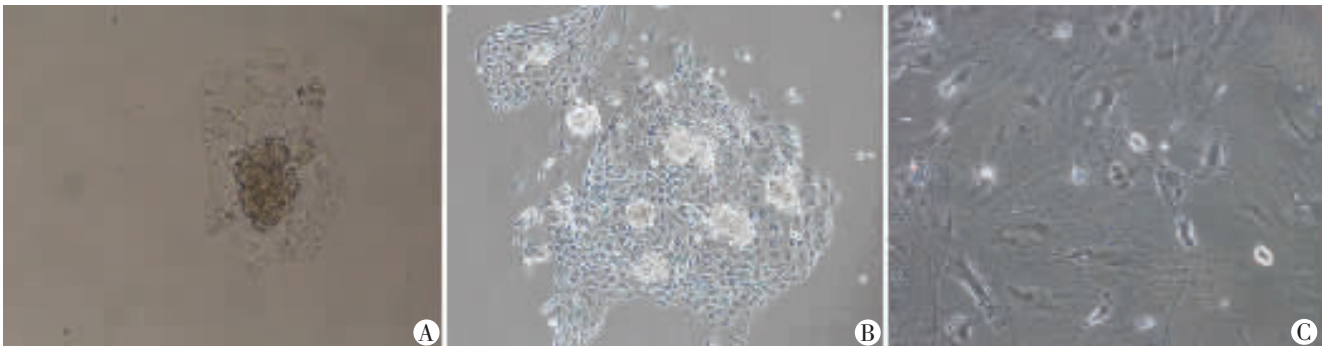
1.4 大鼠肾小球足细胞的鉴定

传代培养7 d待细胞分化铺满瓶底后行免疫荧光染色。冷丙酮固定、Triton X-100破膜、BSA封闭后分别加nephrin、WT-1(1∶1 000)4 ℃过夜,阴性对照组仅加抗体稀释液。加入二抗(1∶30)37 ℃避光反应30 min。PI复染核于荧光镜下观察,取图。上述每步操作后都用PBS洗涤。

1.5 流式细胞仪分析细胞纯度

传代7 d的成熟足细胞消化后,取 1.0×10^5细胞,经固定,加入一抗、二抗后,上机检测nephrin阳性细胞比率。

【基金项目】 广东省科技计划项目(2007B011000009)
【通信作者】 赖德源,电话:(020)81332487



A:肾小球接种第3天(×200);B:肾小球接种第7天(×100);C:传代培养第7天(×200)

图1 肾小球接种后不同时间细胞形态学观察 (相差显微镜)

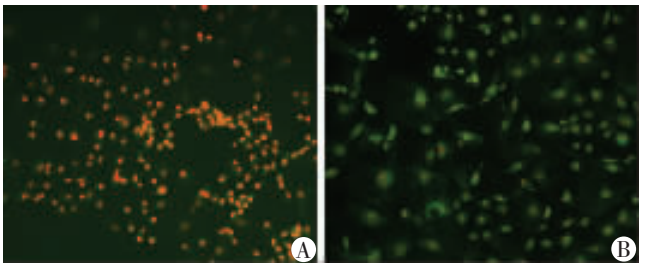
2 结果

2.1 肾小球的分离及培养

①肾小球的分离:纯度达99%,一只大鼠可得到1.0×10^5肾小球,视野中基本无肾小管。②肾小球的培养:经植块法,第3天时可见有少许扁平样细胞从贴壁的肾小球中爬出,有形成血管的趋势,为毛细血管内皮细胞(图1A),第5天时可见绝大部分肾小球贴壁。可见少量肾小球周围有多边形细胞爬出。第7天所有贴壁肾小球周围都有大量细胞爬出,有囊肾小球周围爬出的细胞呈铺路石样,并且有少许大的树枝状细胞在细胞集落的最外圈(图1B)。无囊肾小球周围爬出的细胞呈树枝样(图1C)。用血细胞计数板计数,一只大鼠可获得1×10^6足细胞。

2.2 肾小球足细胞形态学特征

①倒置相差显微镜光镜观察:生长活跃的足细胞体积中等,为多边形,无突起伸出,细胞迅速生长至融合状态,呈铺路石样外观,为去分化状态的足细胞。消化传代后的足细胞继续生长,细胞体和细胞核较增殖状态显著增大,最大直径可达500 μm,自细胞体伸出明显的树枝样突起,常见双核,相邻细胞间形成连接。7 d后可呈完全分化状态。②间接免疫细胞化学染色:WT-1分布于细胞核及核周,PI复染后核重叠(图2A)。在成熟足细胞,nephrin分布于核周及细胞膜,在未成熟足细胞,则分布于核周及细胞质中(图2B)。



A:WT-1位于细胞核及核周,PI复染细胞核merge后可见核染色重叠 (×200);B:nephrin位于核周、细胞质及细胞膜,PI复染细胞核merge后可见细胞核、细胞质及细胞膜 (×100)

图2 间接免疫细胞化学染色观察WT-1、nephrin在大鼠肾小球足细胞的表达

2.3 流式细胞仪分析足细胞纯度

随机选取10 000个细胞,表达nephrin阳性比例为99%。

3 讨论

近年,足细胞的研究快速进展,尤以小鼠和人足细胞株使用较广泛。然而,这种细胞株与体内足细胞尚有一些表型存在差异。虽有报道足细胞株可在体外稳定表达nephrin[7],但足细胞特异性的基因转录水平在足细胞株上表达很低。原代培养像介于细胞株和体内生长之间的桥梁,更接近体内足细胞的生物学特性[8]。

足细胞体外培养的起源来自Krakower等[4,5]的最初方案以及后来由Burlington等[6]改进的方案。分离的肾小球可直接接种到培养瓶中也可先行酶消化。许多学者采用胶原酶、胰酶、脱氧核糖核酸酶进行肾小球消化[9-11]。但酶消化分离目前不是推荐的方法,因为很难控制消化的程度以防止对肾小球的过度消化。近年来,日本学者应用免疫磁珠法分离[12,13],一只成年大鼠可得到20 000个肾小球,半数贴壁,共得到6×10^5细胞。我们在实验中可得到1×10^6细胞,数量相当。另外用健康SD大鼠,取材方便,普通的3层细胞筛网来分离肾小球,较磁珠法节省许多,采用注射器悬滴的方法利用重力轻柔的将肾小球逐层通过细胞筛网,避免大力冲洗对肾小球的损伤,同时也提高了肾小球及足细胞的产量。

在体外培养条件下,最先从肾小球爬出的细胞为毛细血管内皮细胞,但由于内皮细胞对培养基的要求很高,需要特异的血管内皮生长因子才能存活[14],且由于优势生长的原因,生长快的细胞数量会远远超过生长慢的细胞,因此内皮细胞在长出1~2 d后即很快死亡。随后,可见到3种不同的细胞形态出现,一种为从无囊肾小球中爬出的细胞呈分支状的细胞,而从有

囊肾小球中爬出的细胞表现 2 种明显不同的细胞形态,一种是位于集落中心的呈多边形铺路石样的细胞,另一种位于集落的最边上,呈大的不规则形。多数学者普遍认为从无囊肾小球中爬出的细胞与体内足细胞的表型相同,为足细胞来源,大的不规则细胞为壁层上皮细胞转化而来,而多边形细胞的来源问题一直存在着争议。具里程碑意义的是 1997 年,Mundel 等[3] 通过连续观察原代培养的人和大鼠的足细胞发现:①培养最初生长的多边形细胞可以原位转变成树枝状细胞。②从多边形细胞向树枝状细胞转变的过程中伴随着细胞骨架结构的重组。③2 种细胞均表达了足细胞特征性分子 O-乙酰神经节苷脂和 WT-1。这些研究结果证实多边形细胞和树状细胞均来源于足细胞,两者代表了处于不同分化状态的足细胞,当足细胞从肾小球长出时丢失了其分化的表型,并且在长期的培养中又重新获得。基于此,随着转染技术的发展,Mundel 等[15,16] 通过分离转染了温度敏感的 SV40-TAg 的小鼠肾小球,建立了条件永久性的足细胞株,也是目前国内外使用最多的足细胞来源。但此种方法所需要的转基因小鼠价格昂贵,来源困难,Shankland 等[17] 报道这种细胞株很难有效进行转染,转染进去的基因在改变生长环境时发生丢失,限制其推广应用。因此,研究原代培养的方法和技巧也显得尤为重要。由于足细胞的复杂生物学特征,在培养过程中,我们发现以下问题值得特别关注:①第 1 次用完全培养基重悬肾小球时所加的液体量不能过多,一般以刚好铺满培养瓶底面为宜,向培养瓶里加入培养基时注意方向,不能将接种的肾小球冲下来。因为植块法本身即是让组织在贴壁前不要接触培养基,以免受液体的漂浮作用而难以贴壁。②接种 4.5 h 后翻转是我们根据本实验中心的条件摸索出来最适于肾小球贴壁的时间段,我们分别观察了 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0 h,发现 4.5 h 的肾小球贴壁率最高。③文献[18] 报道系膜细胞从肾小球爬出的时间约为第 7 天。我们选择肾小球接种 7 d 后进行消化传代,将含有系膜细胞的肾小球过滤掉,将足细胞进行传代。我们曾观察发现,在第 7 天时如果不传代,而继续换液后培养,从肾小球中逐渐爬出长梭形的细胞,为系膜细胞,形态明显不同于足细胞。

参考文献:

[1] Shankland S J. The podocyte 's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis[J]. Kidney Int, 2006, 69(12): 2131 - 2147.

[2] Saleem M A, O 'Hare M J, Reiser J, *et al*. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(3): 630 - 638.

[3] Mundel P, Reiser J, Zuniga-Mejia-Borja A, *et al*. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines[J]. Exp Cell Res, 1997, 236(1): 248 - 258.

[4] Krakower C A, Greenspon S A. Localization of the nephrotoxic antigen within the isolated renal glomerulus[J]. AMA Arch Pathol, 1951, 51(6): 629 - 639.

[5] Krakower C A, Greenspon S A. The localization of the nephrotoxic antigen(s) in extraglomerular tissues; observations including a measure of its concentration in certain locales[J]. AMA Arch Pathol, 1958, 66(4): 364 - 383.

[6] Burlington H, Cronkite E P. Characteristics of cell cultures derived from renal glomeruli[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1973, 142(1): 143 - 149.

[7] Schiwek D, Endlich N, Holzman L, *et al*. Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines[J]. Kidney Int, 2004, 66(1): 91 - 101.

[8] Poulsom R, Little M H. Parietal epithelial cells regenerate podocytes[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(2): 231 - 233.

[9] Striker G E, Striker L J. Glomerular cell culture[J]. Lab Invest, 1985, 53(2): 122 - 31.

[10] Thomas G J, Bayliss M T, Harper K, *et al*. Glomerular mesangial cells *in vitro* synthesize an aggregating proteoglycan immunologically related to versican[J]. Biochem J, 1994, 302 (Pt 1): 49 - 56.

[11] Kreisberg J I, Hoover R L, Karnovsky M J. Isolation and characterization of rat glomerular epithelial cells *in vitro*[J]. Kidney Int, 1978, 14(1): 21 - 30.

[12] Katsuya K, Yaoita E, Yoshida Y, *et al*. An improved method for primary culture of rat podocytes[J]. Kidney Int, 2006, 69(11): 2101 - 2106.

[13] Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, *et al*. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice[J]. Am J Pathol, 2002, 161(3): 799 - 805.

[14] Akis N, Madaio M P. Isolation, culture, and characterization of endothelial cells from mouse glomeruli[J]. Kidney Int, 2004, 65(6): 2223 - 2227.

[15] Mundel P, Shankland S J. Podocyte biology and response to injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(12): 3005 - 3015.

[16] Mundel P, Reiser J, Kriz W. Induction of differentiation in cultured rat and human podocytes[J]. J Am Soc Nephrol, 1997, 8(5): 697 - 705.

[17] Shankland S J, Pippin J W, Reiser J, *et al*. Podocytes in culture: past, present, and future[J]. Kidney Int , 2007, 72(1): 26 - 36.

[18] 潘晓勤, 王晓燕, 姜新猷. 肾小球系膜细胞培养及鉴定[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 1995, 15(1): 222 - 223.

(收稿 2010-05-06 修回 2010-07-22)

(编辑 邓强庭)