DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.05.019

肾小球系膜细胞体外培养方法的改进

技术与方法

Improvement of glomerular mesangial cell culture in vitro

辛 榕 卞修武 谯怡然 (第三军医大学基础部病理教研室) 630038

肾小球系膜细胞的体外培养有一定难度。1975年Fish等首次在体外培养中分离获得纯系膜细胞(MsC)[1]。现在大鼠、小鼠、兔、人等MsC的培养都有报道,且在细胞生物学及细胞病理学研究方面得到广泛应用。国内于1989年首次报道培养成功大鼠MsC[2]。我室近年来亦进行大鼠MsC体外培养方法的探索,并对收集方法做了一些改进,已成功地用于系膜细胞的实验研究,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 测肾小球直径

用体重分别为185 g和190 g的两只健康Wistar大鼠,取肾脏进行常规石蜡切片和冰冻切片,HE染色,然后用目镜测微器在光学显微镜下测量肾小球直径。每个肾各测200个肾小球,求其平均值。

1.2 肾小球系膜细胞培养

滤过网筛和收集网筛的选用及其使用顺序见表1。

表1 滤过网筛和收集网筛的孔径(单位:μm)及使用顺序

组 别	第一组	第二组	第三组	第四组
第一筛	280	280	180	—
第二筛	125	125	125	125
第三筛	76	65	76	76

其中第一组按照既往报道的方法(对照组)[3],第二~四组为本实验所采用的方法。

1.2.1 提取肾小球:雄性Wistar大鼠,体重180~200 g,分为4组,每组各2只。用脱颈法处死,然后在无菌条件下取出肾脏,剥离肾包膜,剪下肾皮质并将其剪碎。将肾皮质在第一筛上研磨,用D-Hank's液反复冲洗,收集过筛悬液,再依次经过第二筛、第三筛。第二筛可挡住较大组织块,而肾小管节段等过度破碎组织则可通过两筛漏掉。进一步用D-Hank's液洗第三筛,以冲掉附着在筛面上的破碎组织,再收集筛面上的肾小球。

1.2.2 消化肾小球:将0.1%的胶原酶加入收集的肾小球块,置37℃水浴消化25 min。消化过程中不时振摇,消化后用RPMI-1640培养液洗肾小球块2次。

1.2.3 肾小球计数:将消化后的肾小球用5 ml 10% BCS(小牛血清)-1640培养液悬浮。用血球计数板计数,每一组各计数3次,求得其平均值。

1.2.4 肾小球块接种培养瓶:取每组悬液各5 ml分别加入25 ml培养瓶中,置37℃,5% CO_2 孵箱中培养。

1.2.5 培养与观察:培养瓶静置培养3 d后,于倒置显微镜下观察,记录壁层肾小囊脱落情况、肾小球贴壁数多少、悬液中杂质多少及贴壁肾小球周围MsC生长情况等指标。观察后换液,以后每3天换液1次,至第10天左右,当MsC铺满瓶底后,用0.125%胰蛋白酶进行消化、传代。

2 结果

2.1 肾小球直径的均值与数目

冰冻切片和石蜡切片中肾小球直径均值分别为107.34±18.42和71.87±14.70 μm。

第一至第四组肾小球数分别为1×10^5、2×10^5、2×10^5和1×10^5个/ml。

2.2 MsC培养情况

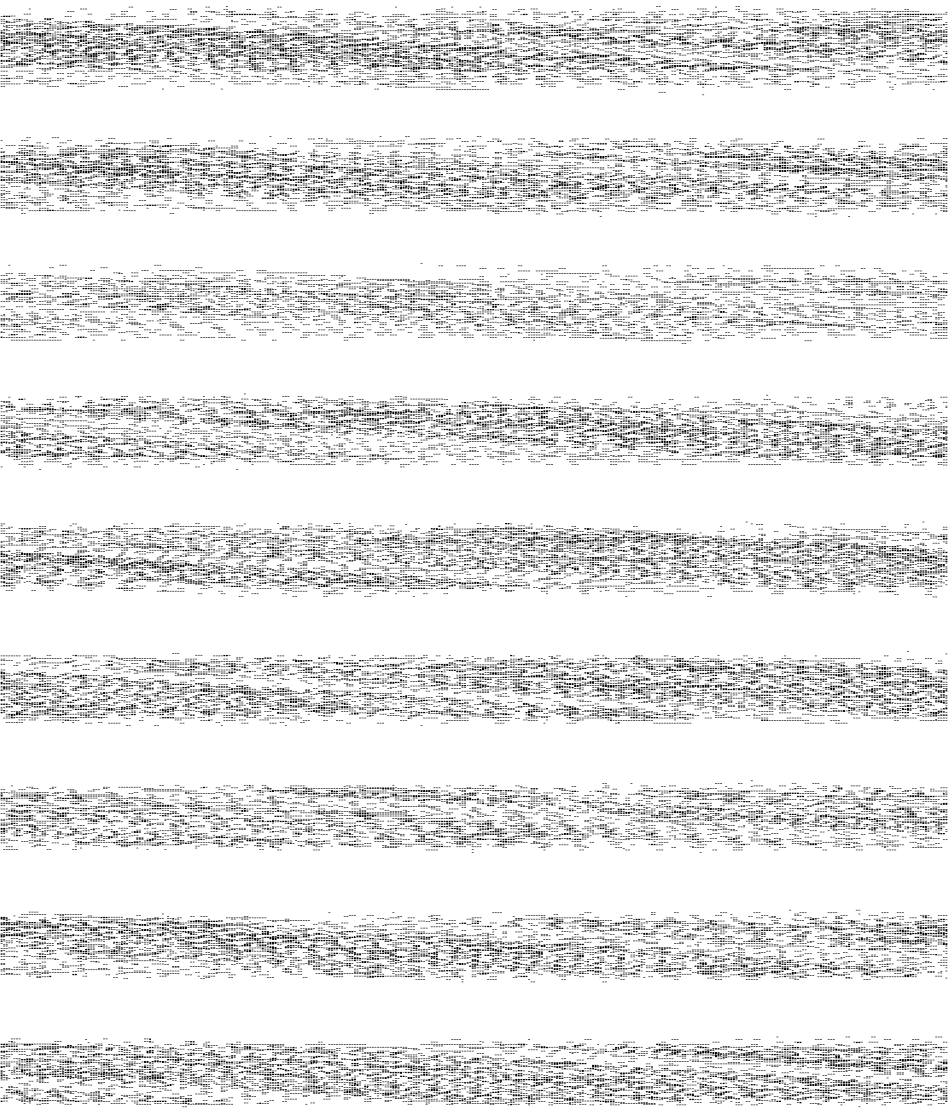
观察记录见表2。

表2 MsC培养观察的几项指标

组 别	第一组	第二组	第三组	第四组
壁层肾小囊脱落率(%)	85	85	95	80
肾小球贴壁率(%)	75	80	90	75
悬液中杂质情况	较多	少	最少	较多
MsC生长情况	较多、较好	多、好	最多、最好	较多、较好

第三组收集的肾小球数量、纯度均较第一组(对照组)好(图1,2);MsC生长也较第一组旺盛、数目多(图3,4)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

保证收集的纯度。

由实验结果可知第三组收集肾小球数多、肾小囊脱落彻底，且肾小球贴壁好、悬液中杂质少，使得MsC生长既多又好，故认为进行MsC培养选用本文介绍的第三组方法为最佳。

关键词 肾小球膜；细胞培养

中图法分类号 R322.61

参考文献

1 Fish AJ, Michael RF, Vernier RL, et al. Human glomerular cells in tissue culture. Lab Invest, 1975, 33: 330

2 谌贻蹊，高 进，邢宝才，等. 肾小球系膜细胞培养. 北京医科大学学报，1989，21(4)：335

3 蒋工伟，陈香美，黎磊石，等. 大黄对体外肾小球系膜细胞生长的影响. 中华肾脏病杂志，1990，6(3)：133

4 Holdsworth SR, Glasgow EF, Atkins RC, et al. Cell characteristics of cultured glomeruli from different animal species. Nephron, 1978, 22: 454

5 董 葆，邹万忠，由江峰. 肾小球系膜细胞增生与系膜硬化机制的初步探讨. 中华病理学杂志，1994，23(1)：10

(收稿：1994-04-08；修回：1994-07-24)

冷冻蚀刻技术在大鼠严重烧伤后肠粘膜病变研究中的应用

Application of freeze-etching technology in pathological study on intestinal mucosa after severe burn injury in rat

张文军 施同舟 (第三军医大学基础部中心实验室) 630038
彭毅志 肖光夏 (第三军医大学西南医院烧伤研究所) 630038

冷冻蚀刻技术是研究生物膜、细胞连接以及细胞突起最主要的手段之一，在呼吸窘迫综合征[1]、肺癌[2]、皮肤癌[3]等疾患研究中已有应用，但用于严重烧伤后肠粘膜病理改变的研究还比较少见。本文应用冷冻蚀刻技术，对严重烧伤大鼠的肠上皮细胞微绒毛、细胞间紧密连接等结构进行了观察，获得了比较满意的结果。

1 材料与方法

Wistar大鼠30只，随机分为早期营养组($n=12$)、烧伤对照组($n=12$)和单纯对照组($n=6$)。早期营养组大鼠腹腔注射戊巴比妥钠30 mg/kg，背部电推剃毛，置剃毛区于92 ℃水中18 s，造成30% TBSAⅡ度烧伤，伤后20 min肠道喂养营养液(ENSURE，美国产)每日180 ml/kg。烧伤对照组用等量的复方乳酸林格式液代替营养液，其它处理同早期营养组。单纯对照组大鼠不致伤，自由进食。早期营养组和烧伤对照组于伤后3、6、12、24 h取材，每组于各时相点将3只大鼠活杀取回肠，修成1.5 mm×1.5 mm×4 mm组织条，置于3%戊二醛内4℃固定，0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗，30%甘油生理盐水(pH7.2～7.4)作冷冻保护8～24 h。将组织修整为0.5 mm×0.5 mm×2 mm长条，放入样品托的小槽内，露出0.3 mm左右，然后把装有组织的样品托快速投入液氮内冷冻。冷冻后放入预冷的EikoFD－3型冷冻蚀刻仪内，在－110 ℃条件下断裂(真空度必须达到1×10^{-6}托)，升温至－100℃蚀刻30 s。然后40°喷铂；90°喷碳3～4次，每次1～2 s。铂碳喷好后取出样品托，滴一小滴0.05%火棉胶溶液在组织上，取出带有复型膜的组织，小心放在干净的白色坩埚内，加入40%铬酸进行腐蚀。待复型膜脱落后，用重蒸水多次清洗，然后用经酒精处理过的300目铜网捞取复型膜，干燥后在JEM－2000EX电镜下观察。

2 结果

单纯对照组大鼠回肠上皮细胞微绒毛排列整齐，结构完整(图1)，上皮细胞间紧密连接连续，彼此构成完整的网状(图2)。烧伤对照组其连续走行的突起数量减少，排列紊乱，有明显的中断现象(图3)，微绒毛排列不整齐，部分缺损，且有脱节现象(图4)。早期肠道营养组肠上皮细胞微绒毛无明显缺损，紧密连接无中断，数量没有减少，但部分排列紊乱(图5)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net