

实验方法

原代大鼠肾小球微血管内皮细胞的培养与鉴定

马华根¹, 刘海琴², 刘昭德³, 唐元瑜^{4,*}

¹北京中医药大学中医学院伤寒教研室, 北京 102488; ²福建中医药大学中西医结合学院, 福州 350122; ³南京医科大学基础医学院, 南京 211116; ⁴福建中医药大学中医学院, 福州 350122

摘要: 本研究旨在建立一种简便高效的原代大鼠肾小球微血管内皮细胞体外培养方法。摘取出生7~10天Sprague-Dawley大鼠的双侧肾脏, 分离出肾皮质; 经剪碎, 连续过200目、300目筛网获得肾小球; IV型胶原酶消化15~20 min后, 收集肾微血管球进行接种培养。通过细胞形态学观察、第VIII因子相关抗原免疫细胞化学染色鉴定所培养的细胞。结果显示: 肾微血管球呈不规则球形, 无包囊, 毛细血管袢结构清晰; 静置培养3天后, 有短梭形细胞从其周围爬出, 并逐渐形成细胞集落, 呈“岛屿状”分布; 4~5天后细胞集落相互融合, 6天后铺满皿底, 呈典型的单层、铺路石样、镶嵌式排列。第VIII因子相关抗原免疫细胞化学染色检测结果显示, 胞质淡染成棕红色, 第VIII因子相关抗原表达为阳性, 阳性率接近100%。以上结果提示, 本研究将连续过筛法和胶原酶消化法结合, 成功建立了简便高效的原代大鼠肾小球微血管内皮细胞体外培养方法, 从而为开展糖尿病肾病的发生和发展机理研究提供了重要的工具细胞。

关键词: 肾小球; 微血管内皮细胞; 连续过筛法; 胶原酶消化法; 第VIII因子相关抗原; 大鼠

中图分类号: R392.33; R33

Primary culture and identification of rat glomerular microvascular endothelial cells

MA Hua-Gen¹, LIU Hai-Qin², LIU Zhao-De³, TANG Yuan-Yu^{4,*}

¹Department of Shang Han, College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; ²College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; ³Basic Medical College, Nanjing Medical University, Nanjing 211116, China; ⁴College of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Abstract: The aim of the present study was to establish a simple and efficient method for isolation and culture of primary rat glomerular microvascular endothelial cells *in vitro*. The bilateral kidneys were taken from 7–10-day old Sprague-Dawley rats, and the renal cortex was separated. Glomeruli were obtained by cutting and continuously passing 200-mesh and 300-mesh sieves. After type IV collagenase digestion for 15–20 min, renal microvascular globules were collected for inoculation and culture. The cultured cells were identified by cell morphology observation and immunocytochemical staining with factor VIII related antigen. The results showed that the renal microvascular globules were irregularly spherical, without cysts, and the capillary loop structure was clear; after 3 days of primary culture, short spindle-shaped cells crawled out around the renal microvascular globules and gradually formed cell colonies, showing an “island-like shape” distribution; 4–5 days later, the cell colonies fused with each other; 6 days later, the cells covered the bottom of the dish, showing a typical monolayer, paving stone-like, mosaic arrangement. The immunocytochemical staining of factor VIII related antigen showed that the cytoplasm was lightly stained brownish red, and factor VIII related antigen-positive rate of cells was nearly 100%. The above results suggested that this study successfully established a method combining continuous screening and collagenase

Received 2021-02-24 Accepted 2021-05-31

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81072714) and the Natural Science Foundation of Fujian Province, China (No. 2017J01545).

*Corresponding author. E-mail: 2422198977@qq.com

digestion for culture of primary rat glomerular microvascular endothelial cells *in vitro*. It provides an important tool cell for studying the mechanism of the occurrence and development of diabetic nephropathy.

Key words: glomerulus; microvascular endothelial cells; continuous screening method; collagenase digestion method; factor VIII related antigen; rats

肾小球微血管内皮细胞 (glomerular microvascular endothelial cells, GMVECs) 是被覆于肾小球毛细血管腔内侧的单层扁平上皮细胞, 与球内系膜细胞、足细胞共同构成肾小球, 参与滤过血浆成分生成原尿, 以维持肾脏的正常生理功能^[1]。而糖尿病肾病作为糖尿病常见的慢性并发症之一, 可通过持续高糖环境促使 GMVECs 发生氧化应激反应, 从而产生大量活性氧簇, 损伤 GMVECs, 进而发展为终末期肾衰竭^[2, 3]。因此, GMVECs 功能障碍在糖尿病肾病的发生和发展过程中起着重要作用^[4, 6]。但目前国内外 GMVECs 的原代培养工作尚未广泛开展, 且体外分离培养 GMVECs 存在操作难度大、培养周期长、细胞产量及纯度低等难点和不足。本研究参考国内外相关文献^[7-10], 将连续过筛法和胶原酶消化法结合, 拟建立一种简便高效的原代大鼠 GMVECs 体外分离培养方法, 从而为开展糖尿病肾病的发生和发展机理研究提供重要的工具细胞。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 出生7~10天Sprague-Dawley大鼠3只, 雌雄不限, 购自福建医科大学实验动物中心, 动物质量合格证号为SCXK(闽)2016-0002。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和国家相关法规。实验动物在麻醉、处死后进行取材, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛和痛苦。

1.1.2 主要试剂及仪器 M199培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司; 肝素钠购自南京新百药业有限公司; HEPES购自Leagene公司; L型-谷氨酰胺、IV型胶原酶购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 兔抗大鼠第VIII因子相关抗原抗体、羊抗兔IgG-免疫组化试剂盒SABC即用型、DAB显色剂、4%多聚甲醛购自武汉博士德生物公司。安泰公司Airtech超净工作台、湘仪公司TDZ4A-WS低速离心机、德国Leica-DFC295倒置生物显微镜、美国Thermo CO₂培养箱。

1.2 方 法

1.2.1 GMVECs原代培养 在动物实验中心, 将待取材的大鼠乙醚麻醉后, 颈椎脱臼处死, 置于75%乙醇中浸泡消毒5 min, 固定于解剖台上, 逐层打开腹腔, 无菌摘取双侧肾脏。在超净台内去除肾脏被膜及髓质, 分离出肾皮质; 预冷PBS液漂洗3次, 将肾皮质剪碎至肉泥样后, 转移到200目筛网上, 用注射器内芯反复轻缓研磨皮质, 同时配合PBS液不断冲洗筛网; 收集筛网下滤液, 用300目筛网再次过滤; 小心收集300目筛网上组织, 与5 mL 0.1% IV型胶原酶混匀后, 于37 °C下振荡消化15~20 min; 离心弃上清, 向离心管内滴加2 mL M199完全培养基(含20%胎牛血清, 100 mg/L肝素钠, 20 mmol/L HEPES, 4 mmol/L L-谷氨酰胺, 1 000 IU/L胰岛素), 与管底的肾微血管球沉淀混匀后接种于直径为6 cm的进口Nunc培养皿内, 放入37 °C、5% CO₂培养箱中静置培养, 3天后全量更换培养液, 其后每隔48 h半量换液1次。上述GMVECs原代培养方法重复3次。

1.2.2 细胞形态学观察 将接种有原代细胞的培养皿置于倒置相差显微镜下观察细胞的形态、贴壁、融合度等生长情况, 并拍照记录。

1.2.3 第VIII因子相关抗原免疫细胞化学染色检测

待原代细胞生长融合度达到85%~90%时, 吸弃原培养基, PBS液漂洗3次, 4%多聚甲醛固定15 min; PBS液漂洗3次, 0.3% Triton X-100透膜15 min; PBS液漂洗3次, 5%牛血清白蛋白室温封闭20 min; 甩干, 滴加1:250稀释的兔抗大鼠第VIII因子相关抗原抗体, 覆盖封口膜, 置于湿盒中4 °C孵育过夜。PBS液充分漂洗, 加入羊抗兔IgG抗体, 37 °C避光孵育30 min; PBS液漂洗3次, SABC 37 °C孵育20 min; PBS液漂洗3次, DAB室温染色, 镜下控制时间, 至胞浆显棕红色, PBS液漂洗3次以终止反应, 并拍照记录。

2 结 果

2.1 肾微血管球形态学观察

经剪碎、连续过筛、IV型胶原酶消化后获得的

肾微血管球, 呈不规则球形, 无包囊, 毛细血管祥结构清晰, 未尿管状组织(图1)。

2.2 原代细胞形态学观察

原代培养3天后, 肾微血管球周围有短梭形细胞爬出, 形成“岛屿状”细胞集落(图2A~B); 4~5天后细胞进入对数生长期, 集落扩大, 逐渐融合成片(图2C~D); 6天后细胞铺满皿底, 形态饱满, 呈典型的单层、铺路石样、镶嵌式排列, 局部出现接触抑制现象(图2E~F)。

2.3 第VIII因子相关抗原免疫细胞化学染色检测结果

细胞染色前呈典型的单层、鹅卵石样、镶嵌式排列(图3A~B); 经第VIII因子相关抗原免疫细胞化学染色后, 胞核呈空泡状结构, 胞浆显棕红色, 第VIII因子相关抗原表达为阳性, 阳性率接近100%(图3C)。

3 讨论

目前国内外尚鲜见有永生化的GMVECs建株成

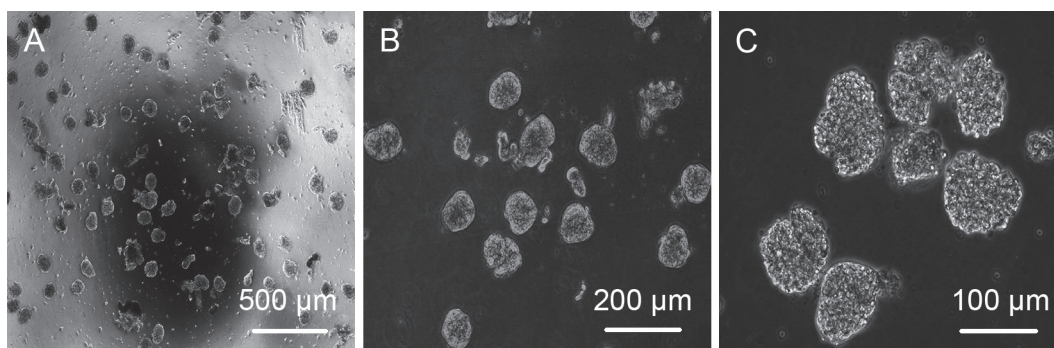


图1. 不同放大倍数下肾微血管球的形态学观察

Fig. 1. Morphological observation of renal microvascular globules under different magnifications. A-C: The primary cultured renal microvascular globules are irregular globules without cysts and with clear capillary loops under microscope. A: Scale bar, 500 μm . B: Scale bar, 200 μm . C: Scale bar, 100 μm .

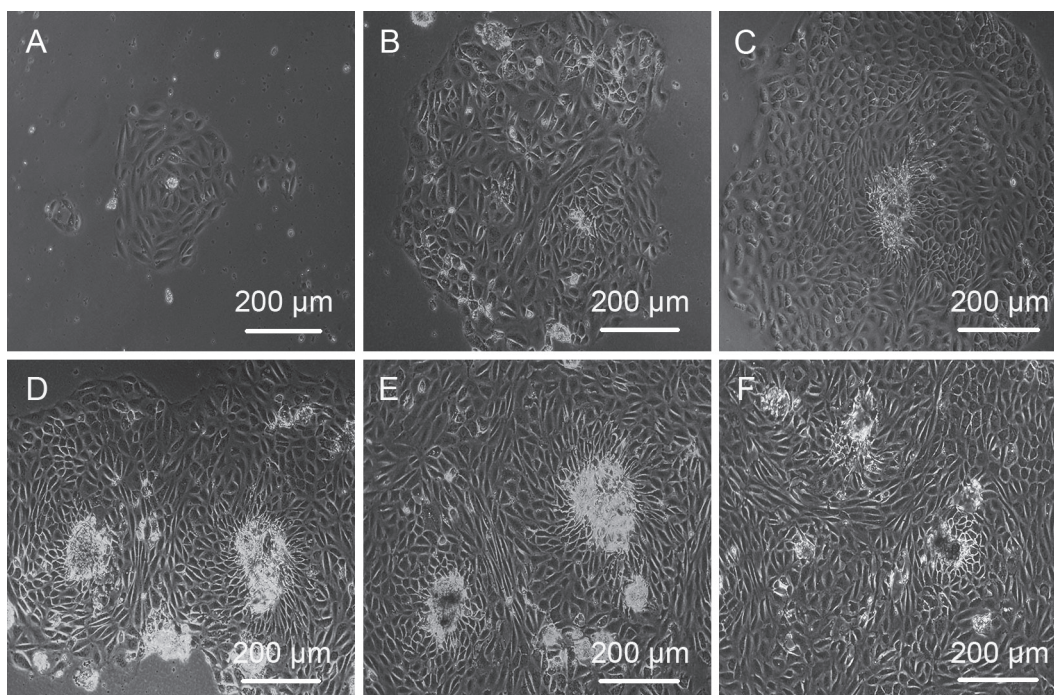


图2. 不同时间点原代培养细胞生长情况的观察

Fig. 2. Observation on the growth of primary cells at different time points. A-B: Culture of 3 days. C-D: Culture of 4-5 days. E-F: Culture of 6 days. Scale bar, 200 μm .

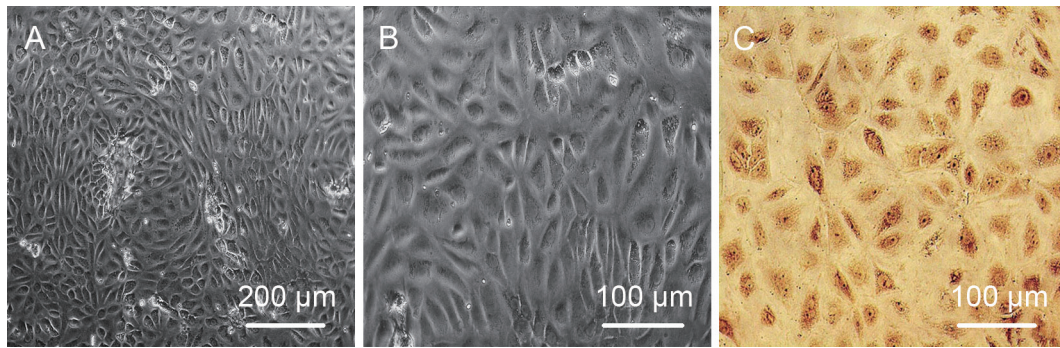


图 3. 第VIII因子相关抗原免疫细胞化学染色检测

Fig. 3. Factor VIII related antigen immunocytochemical staining detection. A–B: The cells before detection. C: Factor VIII related antigen immunocytochemical staining detection. A: Scale bar, 200 μm . B–C: Scale bar, 100 μm .

功的报道^[11]，多数学者只能从培养原代 GMVECs 或构建混合肾小球固有细胞模型入手，开展肾脏疾病的相关研究。自 1984 年 Striker 等^[12] 首次成功分离培养出 GMVECs 以来，国内仅有曾玉等^[8]、赵景宏等^[13] 报道了原代大鼠 GMVECs 的培养方法，这主要是因为其体外分离培养存在肾小球不易获取、微血管球不易贴壁以及细胞生长缓慢、纯度较低等技术难点。本研究将连续过筛法与胶原酶消化法结合，通过选择适当的筛网目数、严格把控肾小球的消化条件，以及增大接种密度等技术环节，有效解决了上述难点，成功分离培养出纯度高、活性好的大鼠 GMVECs。

在原代 GMVECs 培养中，适龄大鼠的选择对于肾小球的分离和内皮细胞的增殖至关重要。以往研究多选用成年大鼠作为取材对象^[8, 10, 13]，本研究经反复对照实验，认为出生 7~10 天的大鼠肾脏尚未发育成熟，组织间连接相对疏松，更容易从中分离出肾小球；且幼龄动物机体生长旺盛，培养出的细胞分裂增殖能力比成年大鼠强，所以是良好的取材对象。GMVECs 的原代培养首先需分离出肾小球，其纯度将直接影响和决定内皮细胞的纯度。本研究综合考虑了大鼠鼠龄与筛网目数的匹配度，在充分剪碎肾皮质后，采用 200 目和 300 目细胞筛网两步过滤分离肾小球，所获得的肾小球纯度可达 98% 以上，相比于以往研究所采用的三步梯度过筛法^[7-9, 13]，省去了一道筛网过滤，从而提高了实验效率并降低了污染风险。而获取肾小球后使其牢固贴壁也是保障原代培养成功的关键。肾小球由大量的毛细血管祥构成，外面被肾小囊包裹，而未脱去包裹的肾小球是不贴壁的，因此需要通过化学酶消化破除包裹。

本研究采用 5 mL 0.1% IV 型胶原酶于 37 °C 振摇消化 15~20 min，高倍镜下可见绝大部分肾小球脱去包裹，毛细血管祥结构清晰，并且消化后的肾微血管球细胞间连接疏松，更有利于 GMVECs 的爬出；其后仅用 2 mL 培养液接种，并绝对静置培养 3 天，可有效防止接种的血管球漂浮。

此外，增大肾微血管球的接种密度，有利于发挥细胞群体优势、提高 GMVECs 的存活率。我们认为肾微血管球的接种密度以 40 倍光学显微镜视野下达到 15~20 个为宜。为满足这一条件，本研究将 3 只大鼠的肾微血管球全部接种于直径为 6 cm 的 Nunc 培养皿中，从而大大缩短了内皮细胞的培养周期。接种 3 天后，肾微血管球已基本贴壁牢固，此时全量更换培养液可清除培养基中悬浮的组织团块和细胞碎片，减少其释放的酶类及炎性产物，有利于 GMVECs 释放活性生长因子并促进细胞之间生长信号的相互传导，从而进一步发挥 GMVECs 的群体优势以抑制杂细胞的增殖。最终培养出的细胞呈现出典型的单层、短梭形、铺路石样、镶嵌式排列等微血管内皮细胞特征，与以往文献报道相符^[7, 13]。由于第 VIII 因子相关抗原是血管内皮细胞特有的生物标志，也是鉴定该细胞最可靠的金指标^[14]，因此本研究进一步通过第 VIII 因子相关抗原免疫细胞化学染色鉴定所培养的细胞，结果显示细胞阳性率接近 100%，表明培养出的细胞为纯度较高的 GMVECs。此外，通过微血管内皮细胞标志物 vWF、VE-cadherin、Dll4、Notch1、CD146 的阳性表达以及透射电镜检测低丰富度的 Weibel-Palade 小体也可明确所培养出的细胞是否为 GMVECs^[15, 16]，我们将在后续实验中进一步进行验证。

总之, 本实验将连续过筛法和胶原酶消化法结合, 对鼠龄、筛网目数、消化条件、接种密度以及换液细节等进行了综合考虑和反复试验, 成功建立了一种简便高效的原代大鼠 GMVECs 体外培养方法, 这为开展糖尿病肾病的发生和发展机理研究奠定了重要的细胞生物学实验基础。

参考文献

- 1 Zhou L (周莉), Lu LM. Isolation and culture of renal glomeruli from rats. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2015; 67(6): 629–635 (in Chinese).
- 2 Zhou ZF (周志锋), Luo R, Kuang H, Wan ZK, Lv JL. Advances in research on the pathogenesis of diabetic kidney disease. *Chin J Diabetes* (中国糖尿病杂志) 2020; 28(4): 303–308 (in Chinese).
- 3 Sheng J, Li H, Dai Q, Lu C, Xu M, Zhang J, Feng J. DUSP1 recuses diabetic nephropathy via repressing JNK-Mff-mitochondrial fission pathways. *J Cell Physiol* 2019; 234(3): 3043–3057.
- 4 Chen BX (陈碧霞), Zhang L, Wu LL, Chen XM. Research progress on the mechanism of endothelial cells injury in diabetic nephropathy. *Med J Chin PLA* (解放军医学杂志) 2020; 45(8): 876–883 (in Chinese).
- 5 Madonna R, Pieragostino D, Balistreri CR, Rossi C, Geng YJ, Del Boccio P, De Caterina R. Diabetic macroangiopathy: Pathogenetic insights and novel therapeutic approaches with focus on high glucose-mediated vascular damage. *Vascul Pharmacol* 2018; 107: 27–34.
- 6 Artunc F, Schleicher E, Weigert C, Fritsche A, Stefan N, Haring HU. The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature. *Nat Rev Nephrol* 2016; 12(12): 721–737.
- 7 Su Z (苏震), Du YY, Liang SK, Huang XY, Xu FF, Huang CX, Xu YL. Isolation and identification of microvascular endothelial cells of human glomerulus. *Zhejiang Med* (浙江医学) 2007; 29(7): 668–670 (in Chinese).
- 8 Zeng Y (曾玉), Deng H, Zhou XJ, Wang J. Isolation, culture and identification of rat glomerular endothelial cells. *Chin J Pathol* (中华病理学杂志) 2005; 34(4): 233–234 (in Chinese).
- 9 Green DF, Hwang KH, Ryan US, Bourgoignie JJ. Culture of endothelial cells from baboon and human glomeruli. *Kidney Int* 1992; 41(6): 1506–1516.
- 10 Rops AL, van der Vlag J, Jacobs CW, Dijkman HB, Lensen JF, Wijnhoven TJ, van den Heuvel LP, van Kuppevelt TH, Berden JH. Isolation and characterization of conditionally immortalized mouse glomerular endothelial cell lines. *Kidney Int* 2004; 66(6): 2193–2201.
- 11 Pang B (逢冰), Zhao LH, Guo Y, Liu Y, Tong XL. Glomerular cell models and their application in the studies on chronic kidney disease in diabetes (CKD). *Chin J Diabetes* (中国糖尿病杂志) 2013; 21(4): 373–375 (in Chinese).
- 12 Striker GE, Soderland C, Bowen-Pope DF, Gown AM, Schmer G, Johnson A, Luchtel D, Ross R, Striker LJ. Isolation, characterization, and propagation *in vitro* of human glomerular endothelial cells. *J Exp Med* 1984; 160(1): 323–328.
- 13 Zhao JH (赵景宏), Huang L, Wang JP, Jin J, Song YM, Fang YQ, Cui B, Yu SY. Culture of endothelial cells from rat glomeruli and the effects of high glucose concentration on its nitric oxide secretion. *Immunol J* (免疫学杂志) 2007; 23(1): 13–15 (in Chinese).
- 14 Bleich HL, Boro ES, Jaffe EA. Endothelial cells and the biology of factor VIII. *Engl J Med* 1977; 296: 377–383.
- 15 Dylewski JF, Wilson N, Lu S, Jat P, Weiser-evans M, Panzer SE, Blaine J. Isolation, purification, and conditional immortalization of murine glomerular endothelial cells of microvascular phenotype. *MethodsX* 2020; 7: 101048.
- 16 McGinn S, Poronnik P, Gallery ED, Pollock CA. A method for the isolation of glomerular and tubulointerstitial endothelial cells and a comparison of characteristics with the human umbilical vein endothelial cell model. *Nephrology* 2004; 9: 229–237.