

小鼠近曲肾小管上皮细胞的原代培养及 P450 酶活性测定

海波¹ 陈朝晖¹ 李智 李璐璐 肖传国*

(华中科技大学同济医学院附属协和医院泌尿外科, 武汉 430022)

摘要 采用胶原酶消化和筛网过滤法分离肾小管,并用 Percoll 密度梯度离心法进一步纯化肾小管上皮细胞,建立小鼠近曲肾小管上皮细胞原代培养方法。利用免疫细胞化学方法鉴定细胞种类,通过乙氧基试卤灵 O-脱乙基酶 (7-ethoxyresorufin-O-deethylase, EROD) 活性方法检测 0、1、3、7 天肾小管上皮细胞细胞色素 P450 (CYPIA1) 的活性。细胞染色结果表明,传 1 代后 98% 的细胞为近曲肾小管上皮细胞,证明此方法是培养小鼠近曲肾小管细胞的有效方法。CYPIA1 在刚分离近曲肾小管上皮细胞中活性较强,在培养 24 h 后明显下降,3 天后基本无活性。

关键词 近曲肾小管上皮细胞; 细胞色素 P450; 免疫细胞化学; 小鼠

肾脏是维持体内内环境稳定的重要器官,而近曲肾小管上皮细胞(proximal tubular cell, PTC)更是发挥肾脏功能最为重要的一类细胞。PTC 在对肾毒性物质、激素、外源性有毒化合物代谢等方面发挥着至关重要的作用^[1]。同时,PTC 与肾缺血性疾病,如大面积烧伤、肾创伤、肾移植术后等引起的肾衰有着密切的联系,它也是研究肾间质纤维化机制的良好模型^[2]。细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 是一类单加氧酶系统,在 PTC 中含量丰富,是肾脏解毒的主要代谢酶^[3]。本研究旨在通过建立良好的近曲肾小管细胞培养模型,为研究肾小管细胞的缺血、缺氧及各种中毒性损伤等的发病机制、治疗药物筛选提供一个良好的实验平台。同时通过测定培养细胞 0、1、3、7 天 CYP450 (CYPIA1) 的活性,了解原代培养的 PTC 中代谢酶的变化情况。

1 材料与方法

1.1 材料

昆明鼠 3 只,雌雄不拘,体重 18~22 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。细胞培养液 DMEM/F12 1:1 (美国 Hyclone 公司),I 型胶原酶、胰蛋白酶、7-乙氧基试卤灵(7-ethoxyresorufin, 7-ER)、双香豆素(dicumarol)、3-MC、DMSO、 β -葡萄糖醛苷酶(β -glucuronidase)、芳基硫酸酯酶(arylsulphatase) (Sigma 公司),胎牛血清(杭州四季青公司)。Percoll 细胞分离液(美国 Pharmacia 公司),抗细胞角素抗体(cytoteratin 18)、链霉亲和素-生

物素-过氧化物酶(SABC)即用型试剂盒、联苯胺(DAB)显色试剂盒购自北京中衫金桥公司。细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)染色试剂盒购自南京建成生物公司。

1.2 细胞的培养

1.2.1 肾小管节段的分离 小鼠实验前 4 h 禁食禁水,以 10% 水合氯醛 3.5 ml/kg 腹腔注射麻醉后无菌取肾,将其置入含有双抗的 4 °C 1×PBS 培养皿中,去除肾包膜,分离剪碎肾皮质约 2 mm 大小,用 PBS 洗净残留血液,将其转移至含 1 g/L I 型胶原酶的 DMEM/F12 溶液中,37 °C 震荡消化 20 min,5 min 吹打一次。消化后的细胞悬液转移至离心管,900 r/min 离心 5 min,去掉上清液,加入胶原酶溶液重复上述消化过程。将消化后的细胞悬液经 200 目筛网过滤去掉较大的肾小管节段和肾小球,滤液转到离心管中,900 r/min 离心 5 min,1×PBS 清洗 3 次。将沉淀用预先配制好的 45% Percoll 分离液重悬,用超速冷冻离心机离心(13 000 r/min,4 °C,30 min),离心后从上到下大致分成 F1~F4 层,取近管底的 F4 层,即为分离纯化的近端肾小管细胞节段^[4]。将分离纯化的肾小管细胞节段用 1×PBS 洗涤,900 r/min,5 min,洗涤 3 次。

1.2.2 细胞成活率测定 用含 0.2% 椎虫蓝的 PBS 重悬上述细胞沉淀,37 °C 5 min,用 4 °C PBS 清洗 3 次

收稿日期: 2009-11-09 接受日期: 2010-01-06

¹ 同等贡献作者

* 通讯作者。Tel: 027-85726303, E-mail: xiaocg@mails.tjmu.edu.cn

后,在显微镜下计数500个细胞,椎虫蓝染色细胞少于5%。

1.2.3 原代培养及传代 在上述离心收集的细胞沉淀中加入含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液并吹打混匀。用细胞记数板调整细胞密度为 5×10^5 个,接种到25 ml培养瓶中,置入37℃、5% CO₂培养箱内温育,6 h后将培养瓶中液体转移到另一25 ml培养瓶中,36~48 h换液。原代培养4~5天,肾小管上皮细胞基本达到90%的融合。倾空瓶内培养液,用PBS洗涤细胞2遍,然后向培养瓶内加入0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA复合液约1.5 ml,放入37℃培养箱内消化2~3 min,拿出后在倒置相差显微镜下观察1~3 min。见瓶内大部分细胞收缩变圆,立即返回操作台内,将消化液倾倒入,加入含血清的培养液,用吸管轻轻吹打,获得细胞悬液。900 r/min离心5 min,然后按1:2分装接种。5天后可传第2代。

1.3 细胞纯度鉴定

1.3.1 免疫组化 采用SABC法对制作的细胞爬片上的近曲肾小管上皮细胞进行免疫组化染色,按照标准步骤进行,一抗为鼠抗细胞角质素抗体cytokeratin 18 (1:200),阴性对照采用PBS代替一抗。二抗为兔抗鼠IgG,以DAB显色。阳性结果为胞核周围及胞质内散在分布的棕褐色颗粒。高倍镜下观察,计数10个连续不重叠的视野中阳性细胞个数,计算阳性细胞百分比。并在流式细胞仪上用cytokeratin 18一抗和FITC标记二抗再次验证细胞的纯度。

1.3.2 碱性磷酸酶染色 PTC刷状缘上有较强的AP活性,利用细胞AP染色试剂盒对培养细胞进行染色。

1.4 CYP1A1活性测定

用乙氧基试卤灵O-脱乙基酶(7-ethoxyresorufin-O-deethylase, EROD)活性方法分别检测PTC培养0天、1天、3天、7天CYP1A1活性。具体做法是将溶于DMSO的3-MC加入PTC培养液中,使终浓度达到2 μmol/L,48 h后加入8 μmol/L 7-ER和10 μmol/L双香豆素,37℃温育30 min,每孔提取375 μl上清液,加入75 Fisherman单位的β-葡萄糖醛酸苷酶(溶于0.1 mol/L醋酸盐缓冲液)和600 Roy单位的芳基硫酸酯酶(溶于0.1 mol/L醋酸盐缓冲液),37℃温育2 h,3 000 r/min离心10 min,荧光分光光度计测试卤灵吸光度。

2 结果

2.1 培养结果

培养12 h见肾小管细胞节段贴壁(图1);24 h后有少量上皮样细胞从肾小管节段周边爬出;72 h后见细胞呈指数样生长。镜下见细胞间紧密相连,融合成片,呈多边形鹅卵石铺路样(图2),可传3代。

2.2 肾小管上皮细胞的鉴定

细胞角蛋白为上皮细胞的特异性标记,肾小管上皮细胞优先表达18型,可用此特性鉴定肾小管上皮细胞。培养细胞中可见大量细胞质呈棕褐色颗粒反应的阳性细胞(图3),细胞大小均一;而PBS对照组胞质内无棕色颗粒。经流式细胞仪测定后浓度在98%以上。AP染色后,在镜下可观察到细胞的胞膜上有深紫色的弧形染色(图4),符合PTC刷状缘上AP阳性的特征。

2.3 CYP1A1活性

采用间接的EROD方法检测PTC的CYP1A1酶活性。初始细胞的代谢活性相对较强,能有效检测到荧光波峰,培养24 h后代谢活性显著降低,3~7天后基本检测不到荧光波峰(<0.45 pmol/min-mg pro)(图5)。

3 讨论

由于PTC在肾毒性、肾衰及肾脏间质纤维化等各种病理变化中发挥着重要作用,因此建立PTC的培养模型对研究这些疾病的发生发展就显得至关重要。目前,国内外虽然已有多种不同种属的永生化肾小管细胞株,如大鼠RRTEp iC、猪LLC-PK1、猴BS-C-1、人HKC和HK2等,但由于过多的传代、基因转染、病毒诱导永生化等过程,使得某些蛋白质的功能和比例与在体细胞不同,长期的培养会使其逐渐丧失上皮细胞的某些特性^[5]。原代培养虽然技术难度大、细胞传代有限,但细胞性质更接近和反映体内生长特性,很适合做肾毒性测试、药物测试、细胞分化甚至生物人工肾小管治疗等实验研究。国内已有不同种属的肾小管上皮细胞培养成功的报道^[6,7],但多采用的是机械研磨加酶消化法,细胞成活率相对较低,且纯化度不高。

由于肾脏的高度异质性,分离纯化同质细胞成为肾小管细胞培养技术的主要难点。用于肾小管上皮细胞分离和培养的方法主要有:筛网分离、显微解剖分离、免疫分离和Percoll连续密度梯度离心等。Percoll分离法不仅具有细胞分离效率高、细胞活性保持好等特点,还可以最大限度地提高近端小管细胞的纯度。本培养体系在胶原酶消化的基础上,通过筛网分离去除肾小球和未消化的大片段,利用Percoll

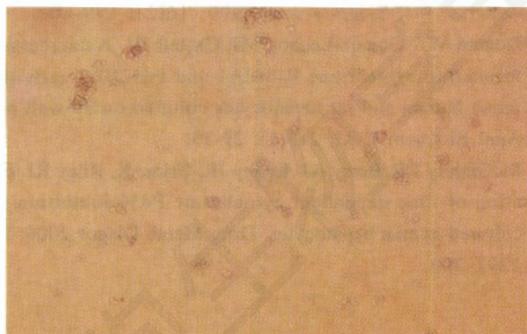


Fig.1 Primary cultures of mouse proximal tubular cells for 12 hours, showed the adherent cells segments, 100×



Fig.2 Culture for 3 days, cells showed a confluent cobblestone appearance, 200×

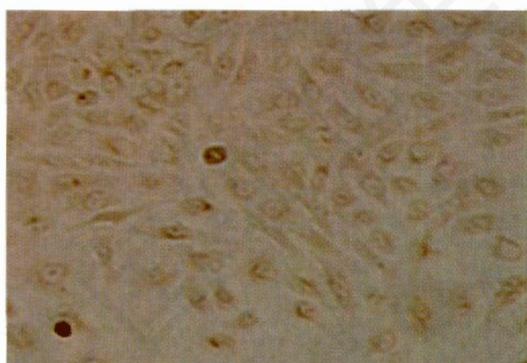


Fig.3 Positive staining of cyokeratin-18, 200×

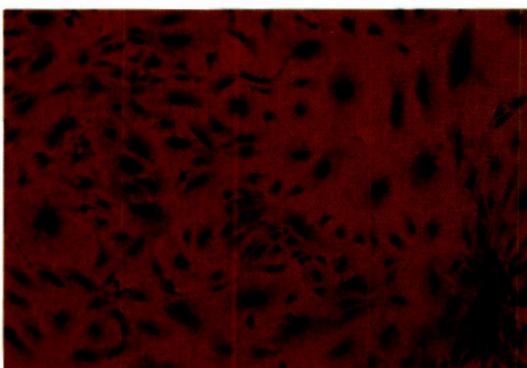


Fig.4 Positive staining of alkaline phosphatase, 400×

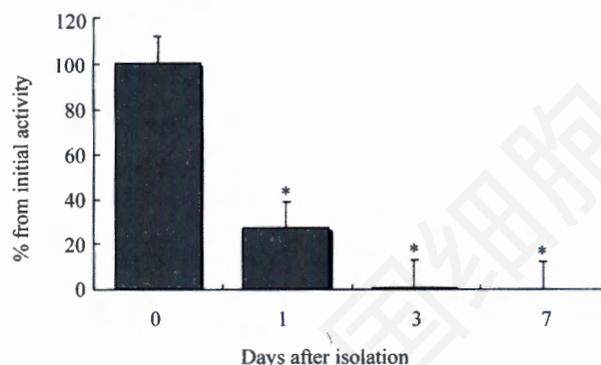


Fig.5 Cytochrome P450 (CYPIA1) isoenzyme activity in primary PTC at 0, 1, 3 and 7 days after isolation expressed as percentage of initial activity

Values represent means from three independent experiments. * Significant difference ($P < 0.05$) from activity in proximal tubular cell at 0 days after isolation.

形成连续密度梯度的特性, 收集密度为 1.062 g/ml 的 F4 层细胞即为 PTC^[4], 经鉴定获得细胞活率高, 纯度在 98% 以上。所以, 此方法具有良好的应用前景。

EROD 是检测 CYPIA1 酶活性的特异性方法, 本实验按照 3-MC 诱导肝细胞中 CYPIA1 活性的方法^[8], 在不损伤培养细胞的情况下, 利用反应底物 7-ER, 通过检测其产物试卤灵荧光性来间接反映酶的活性。我们的研究表明, 在刚分离的 PTC 中可以检测到活力较强的 CYPIA1 活性, 其后 24 h 内活性显著下降, 24 h 后活力仅为初始活性的 27%, 3 天后基本测不出 CYPIA1 活性。在原代培养的肝细胞中也有类似报道, 在最初的 24 h 内培养细胞丧失了 50%~80% CYP450 活性^[9]。因此, 虽然原代培养的 PTC 比永生代细胞系有着很多优点, 但在研究肾脏特异性底物转化方面仍然有着一定的局限性。当然我们也可以利用这一特点, 在比较有或无 CYP450 活性存在时肾毒性化合物的细胞毒性作用试验中, 不需要加入 CYP450 抑制剂。

参考文献(References)

- Cummings BS, Parker JC, Lash LH. Role of cytochrome P450 and glutathione S-transferase alpha in the metabolism and cytotoxicity of trichloroethylene in rat kidney. *Biochem Pharmacol* 2000; 59(5): 531-43.
- Wei Q, Alam MM, Wang MH, Yu F, Dong Z. Bid activation in kidney cells following ATP depletion *in vitro* and ischemia *in vivo*. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(4): F803-9.
- Lohr JW, Willsky GR, Acara MA. Renal drug metabolism. *Pharmacol Rev* 1998; 50(1): 107-41
- Qi W, Johnson DW, Vesey DA, Pollock CA, Chen X. Isolation, propagation and characterization of primary tubule cell culture

- from human kidney. *Nephrology* (Carlton) 2007; 12(2): 155-9.
- 5 Haworth GM. Isolation and culture of human renal cortical cells with characteristics of proximal tubules. *Methods Mol Med* 2005; 107: 283-90.
- 6 毛慧娟, 王笑云, 徐昌芬, 程宝庚. 人肾近端小管上皮细胞的原代培养、传代及鉴定方法研究. *南京医科大学学报* 2004; 24(6): 561-4.
- 7 王东, 吴雄飞, 金锡御. 大鼠肾小管上皮细胞的原代培养及传代. *中华实验外科杂志* 1999; 16(2): 179-80.
- 8 Donato MT, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. A microassay for measuring cytochrome P450IA1 and P450IIB1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 1993; 213(1): 29-33.
- 9 McGinnity DF, Berry AJ, Kenny JR, Grime K, Riley RJ. Evaluation of time-dependent cytochrome P450 inhibition using cultured human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2006; 34(8): 1291-300.

Primary Culture of Mouse Proximal Tubular Cells and Characterization of Cytochrome P450 Enzyme Activities

Bo Hai¹, Zhao-Hui Chen¹, Zhi Li, Lu-Lu Li, Chuan-Guo Xiao*

(Department of Urology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract The renal tubular segments were collected after I collagenase digestion and mesh filtration, followed by Percoll density centrifugation. The cell types were identified by immunocytochemistry using anti-cytokeratin 18. Cytochrome P450 (CYPIA1) activity was characterized using 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) method at day 0, 1, 3 and 7 after isolation. Flow cytometry showed the purity of proximal tubular cell (PTC) reached 98% in secondary cells, which proved the methods of mesh filtration and Percoll density centrifugation were effective. A relatively high CYPIA1 activity could be observed in the first 24 hours after isolation, and then the substrates were metabolized at significant lower rates in 3 and 7 days.

Key words proximal tubular cells; cytochrome P450; immunocytochemistry; mouse

Received: November 11, 2009 Accepted: January 6, 2010

¹Contribute equally to this work

*Corresponding author. Tel: 86-27-85726303, E-mail: xiaocg@mails.tjmu.edu.cn