

# 肾小球细胞培养方法的研究进展

刘静芳 溫进坤

(河北医科大学基础医学研究所生化室 石家庄 050017)

自 70 年代初期, Berink 首次体外培养肾小球成活以来,许多科学家对肾小球细胞培养方法的研究产生了浓厚的兴趣。目前,已培养出 3 种肾小球细胞<sup>[1-3]</sup>,即肾小球系膜细胞(MC)、肾小球表皮细胞(GEC)和肾小球内皮细胞(EC)。单一种类肾小球细胞的分离及培养成功,为深入研究各种肾小球疾病的发病机理及治疗方法奠定了基础。本文就肾小球细胞的分离、培养、鉴定及其主要功能的研究进展作一介绍。

## 一、肾小球细胞的组成及其主要功能

肾小球由血管小球和包裹在它外部的包膜氏囊两部分组成。血管小球分为毛细管丛和系膜区,前者是高度有序的滤过单位,由 EC、肾小球基底膜和 GEC 组成。后者包括 MC 和系膜基质,是肾小球毛细管壁的支持体。肾小球不仅是一个滤过器官,而且,能分泌多种物质,参与体内的代谢调节。

### 1. 肾小球表皮细胞(GEC)

在肾小球发育早期,EC 负责肾小球基底膜的合成<sup>[4]</sup>。在成熟的肾小球中,肾小球基底膜和系膜基质分别由 GEC 和 MC 合成<sup>[5-6]</sup>。肾小球基底膜和系膜基质统称为肾小球细胞外基质,维持肾小球的结构。GEC 与肾小球基底膜和有孔内皮细胞共同组成滤过屏障,对血浆中分子大小及带电荷不同的物质起选择滤过作用。在滤过屏障中,起重要作用的是带负电荷的蛋白多糖。蛋白多糖由蛋白核心及其表面连接的氨基多糖和硫酸氨基多糖(包括硫酸肝素和硫酸软骨素)组成。近年来的研究表明<sup>[7]</sup>,

培养的人和鼠的 GEC 能合成并分泌硫酸氨基多糖及糖蛋白(蛋白多糖的核心部分)。肾小球基底膜中除氨基多糖、硫酸氨基多糖及纤维结合素等非胶原组分外,还有胶原组分,主要是 IV 型胶原。免疫荧光研究结果证明,培养的人和鼠 GEC 能合成 IV 型胶原。I 型和 II 型胶原没有定位于正常的肾小球中。另外, GEC 表面含有带大量负电荷的唾液酸糖蛋白的细胞被,所以,它可通过限制阴离子滤过的方式参与滤过作用。

### 2. 肾小球系膜细胞(MC)

MC 属于特化的可收缩的平滑肌细胞类,并能分泌多种物质,在肾小球结构与功能调节方面起着十分重要的作用。其主要功能包括:(1)通过收缩作用控制肾小球的大小,调节肾血流动力学;(2)合成系膜基质;(3)借其吞噬作用,参与肾小球内大分子物质(如免疫复合物)的清除;(4)可分泌肾素。在正常的肾小球中,MC 的上述功能之间是相互协调的。

随着 MC 培养方法的成熟及细胞和分子生物学技术在 MC 研究方面的应用,对 MC 的生化、生长和代谢方面的认识有了很大进展。现已证实,MC 含有多种因子受体<sup>[8,9]</sup>,例如,白细胞介素类受体、多种生长因子受体及血管紧张素Ⅱ和前列腺素受体等。另外,MC 也可以合成并分泌多种细胞因子和生长因子等<sup>[9-11]</sup>。这些因子以自分泌或旁分泌方式作用于 MC,引起 MC 收缩、增殖和产生系膜基质。MC 表面存在多种抗原,其中胸腺细胞表面抗原(Thy-1 抗原)已作为鼠 MC 的标记抗原。最近有研究表明,培养的人 MC 表面也有 Thy-1 抗原。

### 3. 肾小球内皮细胞(EC)

EC 位于肾小球毛细管壁上，具有直径为 1000 Å 的孔，该孔径可限制大分子物质通过毛细管壁。近年来的研究表明，EC 除参与肾小球滤过作用外，还能分泌多种物质<sup>[12,13]</sup>，其中内皮源性血管舒张因子(即 NO)、内皮素以及血小板生长因子和前列环素等在肾血管功能及 MC 增殖的调节中占有十分重要的地位。此外，EC 也可以合成前列腺素。前列腺素以自分泌或旁分泌方式调节 EC 的增殖。

Dekan 等<sup>[14]</sup>采用免疫组化方法标记 EC，发现 EC 表面有多种特异性抗原，其中，Ⅶ因子抗原已作为体外培养的 EC 的特定标记抗原。另外，在 EC 表面存在胰岛素、胰岛素样生长因子(IGF-1)及转化生长因子(TGF-β)等受体。肾小球内产生的 IGF-1 可通过旁分泌方式作用于 EC，引起其增殖，而 TGF 则抑制其增殖。

#### 4. 壁层表皮细胞

壁层表皮细胞位于包曼氏囊内，包裹在血管小球外部。在某些疾病情况下(如急性肾小球肾炎)，壁层表皮细胞增殖形成新月体。

## 二、肾小球及其细胞的分离

### 1. 肾小球的分离

体外分离培养肾小球的方法已十分成熟，简单地讲，即在无菌条件下取肾脏，分离肾皮质，并将其切成小块，使之通过一系列不锈钢网，最后在高目数网上收集肾小球。选用网筛的标准是：人：80 目、100 目和 150 目；大鼠：100 目、150 目和 200 目；小鼠：100 目、150 目和 300 目。用这种方法制备的肾小球，纯度可达 98% 左右，并基本上除去了包曼氏囊，没有血管极。

### 2. 肾小球细胞的分离纯化

将肾小球种植于培养瓶中，其周围即有细胞长出。但由此得到的肾小球细胞是一组混杂的细胞群，包括 MC、GEC 和 EC。要获得单一类型的肾小球细胞，还需要纯化过程。在所得肾小球细胞混合物中，基本上没有壁层表皮

细胞。因为分离到的肾小球基本上不含包曼氏囊，即便种植了少量带有包曼氏囊的肾小球，也不会贴壁，因此，也就不会有任何细胞向外生长。EC 属于高度分化的细胞，在通常采用的培养条件下，很难生长。所以，纯化肾小球细胞，实际上只需分离 GEC 和 MC。

肾小球细胞的纯化方法，概括起来主要有三种<sup>[1,15]</sup>：(1) 细胞克隆法：用这种方法可得各种纯的肾小球细胞株。但因克隆细胞要求条件高，而其它方法也可得到较单一的肾小球细胞，所以，这种方法不常为人们所采用；(2) 根据 MC 和 GEC 不同时期生长能力的差异分离二者。此法要求种植完整的肾小球，种植后的前 6 天从肾小球周围向外生长的细胞主要为 GEC。此后，GEC 逐渐脱落，代之是 MC，到 30 天左右时，MC 占 100%。因此，如果在培养 6 天时传代，可获得较纯的 GEC，30 天左右传代主要得 MC；(3) 用胶原酶或其它蛋白酶消化肾小球。这些酶选择性地作用于肾小球基质，产生基本上没有 EC 和去除了绝大部分 GEC 的肾小球残体。种植肾小球残体，可获得较纯的 MC。用上述第二、第三种方法纯化培养 GEC 和 MC，均以肾小球贴壁为前提，为了提高肾小球贴壁率，使更多的肾小球细胞向外生长，无论是种植完整的肾小球，还是肾小球残体，都应在种植后的前 4—5 天内勿动培养瓶，以免影响肾小球贴壁。

## 三、肾小球细胞的培养及鉴定

### 1. 肾小球表皮细胞(GEC)<sup>[1,15]</sup>

细胞培养成败的关键是选择培养条件，其中培养基的选择尤为重要。培养 GEC 常用的培养基有：(1) 含有 5% 海狸鼠血清(Nusserum)的 K1 培养基与等体积条件培养基(Swiss 3 T 3 成纤维细胞的培养液)混合物；(2) DMEM/Ham F-12 = 1:1(v/v)，并补加 8% Nusserum，2% 小牛血清(FBS)和生长因子，如胰岛素、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子或转铁蛋白。

白等, (3) RPMI-1640 或 M 199, 补加 10% FBS, 2 mM Gln。条件培养基对肾小球细胞, 包括 GEC 和其它肾小球细胞克隆是必需的, 它可为稀少的细胞克隆提供必需的生长刺激物。在体外, 胰岛素有明显地刺激细胞生长作用, 因此, 用细胞克隆法培养 GEC 时, 常补加胰岛素。

通常采用种植完整肾小球方法培养 GEC, 其过程: 肾小球种植 2—3 天后, GEC 从其周围长出, 6 天左右长满瓶底, 此时可传代培养。

人们尚未找到鉴定 GEC 的特定酶或抗原标记物。目前, 从以下几个方面进行鉴定: (1) 光学显微镜下呈多边形或鹅卵石样; (2) 外生长早; (3) 无Ⅶ因子抗原和 Thy-1 抗原; (4) 表面具有纤毛。为了提高鉴定的准确性, 上述方法宜同时采用。

## 2. 肾小球系膜细胞(MC)<sup>[1,2,15]</sup>

培养 MC 常用的培养基有: (1) 含 20% FBS 的 RPMI 1640 与条件培养基(对数生长期的 Swiss 3T3 成纤维细胞培养液)等体积混合物; (2) RPMI 1640: F 12 = 3:1(v/v), 补加 20% FBS, 1 mmol/L Gln 和 6 mmol/L 葡萄糖; (3) RPMI 1640 或 DMEM 补加 20% FBS, 2 mM Gln, 15—20 mmol/L Hepes, 有或无胰岛素。前两种培养基常用于细胞克隆法培养 MC。另外, 也有人用含 15—20% FBS 的 M 199 或 Waymoultis 培养基培养人 MC。

培养 MC 的常用方法是: 用 IV型胶原酶消化肾小球, 得肾小球残体后, 接种于培养瓶中进行培养。MC 一般 3—5 天长出, 2 周左右长满, 用胰蛋白酶-EDTA 液消化后传代培养。

GEC 和 MC 的生长所依赖的条件不同, GEC 在低血清浓度(10%), 培养瓶事先用胶原凝胶包被的条件下生长最好。而 MC 在塑料瓶中, 高血清浓度(20%)条件下生长最好。如果把 MC 接种于用胶原凝胶包被的培养瓶中, 以 K 1 作为条件培养基, 补加低浓度血清时,

MC 不增殖。同样, GEC 在塑料瓶中, 高浓度血清条件下生长不好, 即使在原代培养时, 有 GEC 长出, 但一经传代, 它们就不再贴壁了。借助 GEC 和 MC 对培养条件的选择性差异, 通过控制条件, 可获得纯的 GEC 和 MC。

MC 的鉴定方法: (1) 在相差显微镜下, MC 呈星射状、纺锤形或丘结状, 明显不同于 GEC 和 EC。这些形状的 MC, 在代谢方面的差异还不清楚; (2) 鼠 MC 表面上有特定的 Thy-1 抗原, 该抗原已作为鼠 MC 特异标记抗原; (3) MC 含有大量平行于细胞质膜的纤维束、平滑肌肌动蛋白、肌球蛋白、结蛋白和波形蛋白, 缺少Ⅶ因子等。因此可用抗平滑肌肌动蛋白、肌球蛋白和结蛋白等抗体对 MC 进行免疫学鉴定。

## 3. 肾小球内皮细胞(EC)

EC 属于高度分化的细胞, 对培养条件要求严格, 这就给细胞培养工作带来了一定的困难。但由于它在多种肾小球疾病的发生过程中起着重要作用, 所以有很多研究者热心于 EC 培养方法的研究, 并初步建立了一些培养和鉴定方法<sup>[3,16~18]</sup>。

Striker 等<sup>[16]</sup>虽然早在 1984 年就培养出 EC, 但他们建立的方法存在细胞不纯, 几次传代后 EC 表型变化及重要性差等问题。1989 年, Barbara 等<sup>[17]</sup>对 Striker 的方法加以改进, 采用流式细胞技术分离出高纯度的 EC 后, 选择含有 EC 促生长因子(A II 转换酶和Ⅶ因子)和抑制 MC 生长的培养液进行培养并获得成功。1992 年, Green 等<sup>[18]</sup>在培养基中加入 EGF 和肝素, 用纤维结合素包被培养瓶, 培养出人 EC。目前, EC 的培养方法远不如 GEC 和 MC 成熟, 但上述已建立的方法, 为深入研究 EC 在肾脏病的发生过程中所起的作用提供了必要的手段。

## 四、问题与展望

肾小球细胞的体外培养为肾小球病理生理方面的研究开辟了广阔的前景。但在培养及鉴

定方法方面目前仍存在一些问题：(1) 培养的肾小球细胞(如 GEC)，缺乏特定酶或抗原标记物，主要靠形态学鉴定，这就难以确定是否存在其它肾小球细胞的污染；(2) 目前所采用的肾小球细胞培养基中，均含有 10—20% FBS，而且常常补加胰岛素。在这样的条件下研究各种肾小球细胞的代谢调节是难以得到肯定的结果的，应努力为各种肾小球细胞建立无血清培养基；(3) 在体外培养肾小球细胞多是将细胞种植于塑料瓶、玻璃瓶或是包被后的培养瓶中，这种环境与体内迥然不同。例如，MC 在体内存在于系膜区，由系膜基质包围。研究表明<sup>[19]</sup>，系膜基质对 MC 的表型及代谢过程影响很大。若能模拟体内环境培养 MC，研究其结构与功能将更有意义；(4) 尚存在一些矛盾的结果，如 MC 是否有吞噬活性，GEC 膜上是否存在 C3b 受体等。

总之，肾小球细胞培养方法的研究虽已有 20 多年的历史，但目前仍处于不断发展阶段，还需要很多工作使之进一步完善和发展。

### 摘要

种植完整的肾小球或用胶原酶消化后的肾小球残体，借助细胞自肾小球向外生长的能力，已培养出三种肾小球细胞，即肾小球表皮细胞、系膜细胞和肾小球内皮细胞。应用细胞及分子生物学技术研究单一种类肾小球细胞的结构与功能，发现这些细胞能合成和分泌多种细胞因子和生长因子，这些因子以自分泌或旁分泌方式调节肾小球细胞的代谢过程。

### 参考文献

- [1] Harper, P. A., 1984, *Kidney Int.*, 26: 875—880.
- [2] 于力方等, 1990 年, 中华肾病杂志, 6: 70—74.
- [3] LauLajainen, T. et al., 1993, *Lab. Invest.*, 69: 183—192.
- [4] Abrahamson, D. R., 1987, *Am. J. Physiol.*, 253: F 783—F 794.
- [5] Nakamura, T. et al., 1992, *Kidney Int.*, 41: 1213—1221.
- [6] Abrass, C. K. et al., 1994, *Kidney Int.*, 46: 613—620.
- [7] Stow, J. L. et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3296—3300.
- [8] Abboud, H. E. 1992, *Kidney Int.*, 41: 581—583.
- [9] Davies, M., 1994, *Kidney Int.*, 45: 320—327.
- [10] Jaffer, F. E. et al., 1990, *Kidney Int.*, 38: 1193—1198.
- [11] Ruef, C. et al., 1990, *Kidney Int.*, 38: 249—257.
- [12] Lamas, S. et al., 1991, *Am. J. Physiol.*, 261: C 634—C 641.
- [13] Marsden, P. A. et al., 1991, *Am. J. Physiol.*, 261 (1 Pt 2): F 117—F 125.
- [14] Dekan, G. et al., 1990, *Am. J. Physiol.*, 259: 913—927.
- [15] Gary, E. S. et al., 1985, *Lab. Invest.*, 53: 122—131.
- [16] Striker, G. F. et al., 1984, *J. Exp. Med.*, 160: 323—326.
- [17] Barbara, K. et al., 1989, *Am. J. Physiol.*, 256: C 182—C 189.
- [18] Green, D. F. et al., 1992, *Kidney Int.*, 41: 956—960.
- [19] Marx, M. et al., 1993, *Kidney Int.*, 43: 1027—1041.

## 抗冻蛋白与细胞的低温和超低温保存

王君晖 黄纯农

(杭州大学生命科学学院 杭州 310012)

抗冻蛋白(AFP, Antifreeze Proteins)最早发现于极地海洋鱼类，它能非连续地降低体液冰点，并通过吸附于冰晶的特殊表面有效阻

止和改变冰晶生长。现已证明，一些陆生节肢动物、维管植物、非维管植物、真菌和细菌等，也存在抗冻蛋白<sup>[1]</sup>。鱼类抗冻蛋白一般分成四