

# 猕猴原代肾小球系膜细胞分离提取培养与鉴定

刘潇一,张春梅,张磊,许振,魏琦,蒋海峰,董婷玉,杨雪枝,严尚学,常艳,魏伟

**摘要** 目的 探索一种简单方便、重复性好的非人灵长类动物原代肾小球系膜细胞(GMCs)体外提取、培养及鉴定的方法。方法 在无菌条件下取出猕猴肾脏,利用两种不同孔径的纱网(介于100目到200目之间)分离出肾小球,设置不同浓度(0.1、0.2 mg/ml)VI型胶原酶消化肾小球,同时在这两个浓度基础上设置不同消化时间(10、15 min),将消化后的肾小球接种到细胞瓶中,观察不同消化条件下GMCs的生长状况。显微镜下观察GMCs的结构,免疫荧光和Western blot法检测GMCs中 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、Nephrin蛋白的表达。利用肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )刺激后观察GMCs生物学特性,CCK-8法和高内涵细胞成像系统法分别检测GMCs活力和增殖情况;Transwell法和细胞划痕实验检测GMCs迁移能力。结果 利用0.1 mg/ml VI型胶原酶消化10 min搜集到的肾小球贴壁较多,肾小球细胞生长状态较好。原代培养的肾小球3 d贴壁,7 d开始移出不规则形状或星状的细胞,经21~35 d GMCs逐渐铺满瓶底。GMCs中 $\alpha$ -SMA蛋白阳性,Nephrin蛋白阴性。10 ng/ml TNF- $\alpha$ 体外刺激能显著增强GMCs的增殖与迁移能力。结论 利用胶原酶消化法(0.1 mg/ml VI型胶原酶消化10 min)成功建立了GMCs的分离及培养的方法体系,为之后更好模拟人类肾脏疾病提供合适的细胞模型。

**关键词** 猕猴;肾小球系膜细胞;原代细胞培养;胶原酶消化法

**中图分类号** R322.1-21,R-331

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2022)08-1222-07  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.009

有报道<sup>[1]</sup>认为,大约10.8%的人群会受到肾脏疾病的影响。肾脏疾病主要损害的病理部位是肾小球,肾小球是肾组织中主要起滤过作用的单位<sup>[2]</sup>。肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cells, GMCs)

过度增殖是肾小球疾病(如肾小球肾炎、狼疮性肾炎、糖尿病肾病等)的主要病理特征<sup>[3]</sup>。

肾小球主要由内皮细胞、上皮细胞和GMCs组成。原代肾组织中细胞提取培养中,与内皮细胞与上皮细胞相比,GMCs是较易生长的肾小球细胞,因为它们的生长需求最小,增殖能力较强<sup>[4]</sup>。目前已有对大鼠、小鼠、兔、人及猪的GMCs分离方法的报道<sup>[5]</sup>,但尚未见对猕猴原代GMCs分离方法的报道。有文献<sup>[6]</sup>报道称,可以利用小鼠肾脏进行GMCs培养,但其操作步骤繁琐,利用50、100目和200目三道筛网才能筛出纯度较高的肾小球组织。肾小球位于肾脏肾皮质部位,小鼠肾皮质部位小,需要足够量的小鼠肾组织才能贴出GMCs<sup>[6]</sup>。人原代GMCs的提取方法也有报道<sup>[7]</sup>,但是取材较为困难(一般为胎儿的肾)。与其他实验动物相比,猕猴与人类的遗传基因、生理病理状态以及免疫反应和新陈代谢具有高度的相似性,社会行为也与人类类似,是基础研究和临床应用之间的一个理想转化模型<sup>[8]</sup>。该研究结合已有的文献报道,以及GMCs的生理特性和生长要求,成功建立了猕猴原代GMCs的分离培养方法,并对其进行鉴定和功能研究,为进一步研究提供实验材料与工具。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 选取12只3~5岁普通级雄性实验猕猴,体质量为4~6 kg,饲养于安徽医科大学临床药理研究所实验动物中心。温度:20~26℃;日温差: $\leq 4$ ℃;相对湿度:40%~70%。昼夜交替满足猕猴作息时间,饲料、水不受限制,通过瓜果蔬菜补充营养,定时为猕猴播放音乐及视频,严格遵守动物福利标准。实验动物购自旌德县皖南猕猴驯养繁殖基地,生产许可证号:SCXK(皖)2020-001。实验动物使用许可证号:SYXK(皖)2020-001。该实验过程经安徽医科大学临床药理研究所动物伦理委员会批准(批准号:PT-2020-001)。

**1.2 主要实验试剂及仪器** 注射用盐酸替来他明盐酸唑拉西洋(舒泰50)购自上海维克有限公司;DMEM基础培养基和胎牛血清(fetal bovine serum,

2022-05-15 接收

基金项目:安徽高校重点科研平台协同创新项目(编号:GXXT-2020-065)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,安徽医科大学风湿关节炎研究中心,合肥 230032

作者简介:刘潇一,女,硕士研究生;

常艳,女,博士,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: yychang@ahmu.edu.cn;

魏伟,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

FBS)购自以色列 Biological Industries 公司; 0.25% 胰蛋白酶(含 EDTA)购自上海碧云天生物技术研究所;小鼠肾小球系膜细胞系 SV40 MES 13 购自武汉普诺赛(Procell)生命科技有限公司;DAPI 染色液和 0.5% 结晶紫水溶液购自北京索莱宝生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒购自合肥 Biosharp 公司;TNF- $\alpha$  购自美国 PeproTech 公司; $\alpha$ -SMA(兔抗单克隆抗体,美国 Proteintech 公司)、GAPDH(兔抗单克隆抗体,美国 Proteintech 公司);Nephrin(兔多克隆抗体,美国 affinity 公司)抗体;Transwell 小室均购自美国 Corning 公司;VI 型胶原酶购自美国 Sigma 公司。DMI1 型倒置生物显微镜:徕卡显微系统(上海)有限公司;BX 53 正置显微镜:日本 OLYMPUS 公司;Image Xpress Micro4 型高内涵细胞成像分析仪:美国 Molecular Devices 公司;Infinite M1000 PRO 多功能酶标仪:瑞士 TECAN 公司。

### 1.3 猕猴肾小球系膜细胞分离及培养方法

**1.3.1 动物麻醉与提取肾小球** 猕猴在肌肉注射舒泰 50(6 mg/kg)深度麻醉后,采取股动脉放血处死。猕猴处死后解剖,在超净台中沿腹部中线打开腹腔,无菌取出猕猴肾脏。利用预冷的无菌生理盐水冲洗肾脏,去除肾组织中的血块和血红细胞,之后转移至另一个空的无菌大皿中。利用无菌眼科剪、眼科镊去除多余肾组织(如:肾盂和肾包膜),利用无菌手术刀剖开肾脏,取一小块肾皮质。将肾皮质放入无菌 1.5 ml 离心管中,利用无菌眼科剪剪碎肾皮质,组织块大小  $\leq 1 \text{ mm}^3$ ;加入少量混有高糖 DMEM 的无菌生理盐水混匀,利用巴氏吸管分次吸取剪碎的肾组织悬液放到重叠的 2 层纱网上(上 100 目,下 200 目),利用 5 ml 注射器轻碾组织块,同时利用无菌生理盐水冲洗,直至组织块发白;将 200 目纱网转移到无菌大皿中,巴氏吸管吸取无菌生理盐水反复反向冲洗 200 目纱网上碾碎的组织块,收集冲下的组织块,转移至无菌 15 ml 离心管中。离心管低速离心 5 min,转速 1 000 r/min,之后弃去上清液,加入适量的无菌生理盐水构成肾小球悬液,整个过程尽量控制在 2~3 h 之内且保持无菌操作。

**1.3.2 肾小球活性鉴定及计数** 取上述肾小球组织悬液 90  $\mu\text{l}$ ,加入定量 10  $\mu\text{l}$  的 0.4% 台盼蓝溶液充分混匀,5 min 后立即取 10  $\mu\text{l}$  滴于覆以盖玻片的细胞计数板上,5 $\times$ 物镜下观察提取肾小球的数量、染色情况及有无脱去布曼囊,并进行肾小球计数。肾小球活性及浓度的计算公式<sup>[9]</sup>如下

$$\text{肾小球活性} = \frac{\text{总肾小球数} - \text{着色肾小球数}}{\text{肾小球总数}} \times 100\%$$

**1.3.3 猕猴肾小球消化与接种肾小球** 在肾小球悬液中分别加入不同浓度的 VI 型胶原酶(0.1 mg/ml 及 0.2 mg/ml)和 0.02 mg/ml DnaseI,分别放入 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中震荡充分消化不同时间(10 min 和 15 min),之后加入 2 ml 20% FBS-DMEM 培养液终止消化,充分混匀。再迅速以 1 000 r/min 转速,离心 5 min。尽量完全去除上清液,加入 500  $\mu\text{l}$  20% FBS-DMEM 培养液进行重悬。利用移液枪吸取适量重悬液至培养瓶中(尽量铺满瓶底),同时轻轻晃动培养瓶使上述肾小球悬液均匀铺在瓶底后,将培养瓶的培养面朝上放入 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中,使肾小球组织块贴壁,4~5 h 后再缓慢将细胞瓶翻面培养,并加入 3 ml 20% FBS-DMEM 培养液,使完全培养液浸润,培养细胞。注意 3 d 内勿晃动培养瓶,4 d 采用半定量换液,目的是给贴壁肾小球组织适应环境;8 d 首次全量换液并观察肾小球细胞生长情况,之后每隔 3 d 全量换液 1 次,直至细胞铺满瓶底进行首次消化传代。

**1.3.4 原代系膜细胞的传代培养** 往培养瓶内加入适量 0.25% 胰蛋白酶(含 EDTA)消化肾小球细胞(细胞以铺满瓶底为度,同时消化液应提前在室温条件下进行复温),置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中 1 min 后拿出,在倒置显微镜下观察细胞形态变化(细胞回缩变圆)时加入完全培养液终止其消化。用移液枪吸取培养液,轻轻反复吹打培养瓶壁上的细胞,收集细胞悬液于 15 ml 离心管中,以 1 000 r/min 的转速,离心 5 min,弃去上清液,使用适量 20% FBS-DMEM 培养液重悬细胞。细胞计数板计数后,稀释成适当密度接种于新的培养瓶中继续培养。

### 1.4 猕猴原代系膜细胞的鉴定

**1.4.1 形态学观察** 倒置光学显微镜观察并拍照记录猕猴原代 GMCs 形态特征和生长状况。

**1.4.2 免疫荧光鉴定** 选择状态良好的 GMCs(3~4 代)种在铺有无菌盖玻片的 24 孔板中培养 24 h,利用 SV40 MES 13(小鼠系膜细胞系)做阳性对照,细胞密度约为 50%~60%。加入 PBS 轻轻晃动洗涤 3 min  $\times$  2 次;加入预冷的 4% 多聚甲醛固定 20 min,弃去,加入 PBS 轻轻晃动洗涤 3 min  $\times$  3 次;加入含 0.5% BSA 的 PBS,室温封闭 30 min,弃去封闭液;分别在加入抗兔的 Nephrin 和  $\alpha$ -SMA 一抗(一抗浓度为 1:100),4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,加入 PBS 轻轻晃动洗涤 3 min  $\times$  3 次;加入 594 标记的山羊抗兔二抗(1:

1 000) 37 °C 摇床赋予 2 h, PBS 轻轻晃动洗涤 5 min × 3 次; 加入 DAPI 染细胞核, 室温摇床赋予 8 min, PBS 轻轻晃动洗涤 5 min × 3 次; 抠片加入抗荧光淬灭剂, 封片; 荧光显微镜下观察。

**1.4.3 Western blot 法检测蛋白表达** 利用配置好的细胞裂解液提取本方法获得的 GMCs 以及 SV40 MES 13 的蛋白, 配制 10% 的 SDS-PAGE 凝胶, 上样电泳, 转移至 PVDF 膜上, 利用 TBST 配制的 5% 脱脂牛奶 37 °C 摇床封闭 2 h, 洗去牛奶后, 用 1 : 1 000 的兔抗 Nephritin 和  $\alpha$ -SMA 多克隆抗体或 1 : 1 000 兔抗 GAPDH 抗体 4 °C 条件下孵育过夜, 1 : 10 000 兔二抗 37 °C 摇床孵育 2 h, 洗去二抗后, 加入提前配置好的显影液曝光, 采用 Image J 图像分析软件进行条带灰度值分析, 比较各组之间的差异。

### 1.5 猕猴肾小球原代系膜细胞功能实验

**1.5.1 高内涵检测细胞增殖能力** 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 20% FBS-DMEM 培养液终止消化, 并制备细胞悬液。细胞计数, 以  $0.4 \times 10^4$  个细胞均匀铺入 96 孔板, 利用 10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 24 h<sup>[10]</sup>。96 孔板用生理盐水洗 3 次, 每次 3 min。4% 多聚甲醛固定 30 min, 并用生理盐水清洗。加 DAPI 染核 5 ~ 8 min, 生理盐水洗 3 次, 加入适量生理盐水, 并用高内涵成像系统拍照。

**1.5.2 CCK-8 法检测细胞生长活力** 细胞制成悬液后, 以  $0.4 \times 10^4$  个/孔铺入 96 孔板, 饥饿处理之后 24 h 加 10 ng/ml TNF- $\alpha$ 。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱培养 24 h, 生理盐水洗涤细胞。每孔加 100  $\mu$ l 20% FBS-DMEM 完全培养液、10  $\mu$ l CCK-8 试剂继续培养 1 ~ 2 h 后, 利用酶标仪检测其吸光度 ( $\lambda = 450$  nm)。

**1.5.3 Transwell 法检测猕猴肾小球系膜细胞迁移能力** 细胞制成悬液后, 接种于 24 孔板, 10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 24 h。消化细胞并将 Transwell 小室放入 24 孔板, 上室加细胞悬液, 下室加 20% FBS-DMEM 培养液。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中迁移

24 h; 将小室放入 4% 多聚甲醛固定 30 min; 并用生理盐水清洗; 含 0.1% 结晶紫的生理盐水, 染色 20 min; 显微镜下观察拍照, 每组随机选取 9 个视野, 统计迁移细胞数目。

**1.5.4 细胞划痕实验检测猕猴肾小球原代系膜细胞迁移能力** 取原代 GMCs, 24 h 后融合率达 100% 后, 用 200  $\mu$ l 无菌枪头垂直于孔板底部中央划痕, 弃去培养基, 无菌 PBS 冲洗脱落细胞, 10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 24 h, 分别于 0、24 h 进行拍照, 观察划痕愈合情况, 计算划痕愈合率。划痕愈合率 (%) = (0 h 划痕距离 - 24 h 划痕距离) / 0 h 划痕距离 × 100%。

**1.6 统计学处理** 以 SPSS 20.0 软件、GraphPad Prism 9.0 软件分别进行统计分析 with 图形绘制相关工作。所得实验数据均通过  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较通过 *t* 检验进行数据统计,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肾小球提取条件的比较** IV 型胶原酶不同浓度和消化的时间, 细胞最开始爬出的速度及状态不同。3 d 观察 0.1 mg/ml IV 型胶原酶消化 10 min 的肾小球贴壁较多, 0.2 mg/ml IV 型胶原酶消化 15 min 的肾小球贴壁较少。7 d 后 0.2 mg/ml IV 型胶原酶消化 10 min, 15 min 和 0.1 mg/ml IV 型胶原酶消化 15 min 的肾小球细胞呈星形或纺锤形细胞数量较少, 生长缓慢 (图 1A ~ D); 0.1 mg/ml IV 型胶原酶消化 10 min 的肾小球细胞生长状态较好 (图 1A)。21 d 后 0.2 mg/ml IV 型胶原酶消化 15 min 的肾小球已无细胞生长, 0.1 mg/ml IV 型胶原酶消化 15 min 的肾小球细胞有较少的细胞生长; 0.1 mg/ml IV 型胶原酶消化 10 min 的肾小球细胞生长旺盛。

**2.2 肾小球系膜细胞的形态学鉴定** 经 2 种不同目数的纱网提取的肾小球用 0.4% 台盼蓝染色后于倒置显微镜下观察显示: 大部分肾小球均脱去布曼

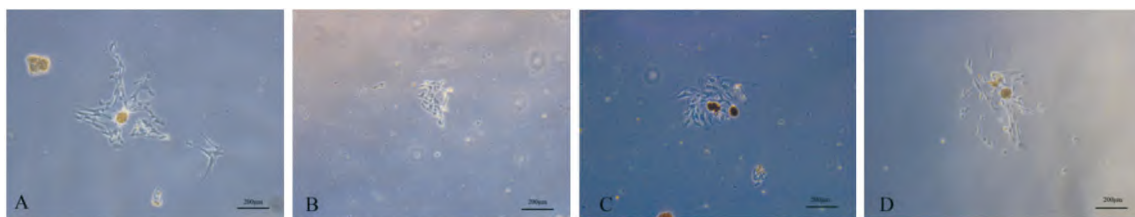


图 1 D7 原代肾小球细胞生长情况 × 50

A: 0.1 mg/ml 消化 10 min; B: 0.1 mg/ml 消化 15 min; C: 0.2 mg/ml 消化 10 min; D: 0.2 mg/ml 消化 15 min

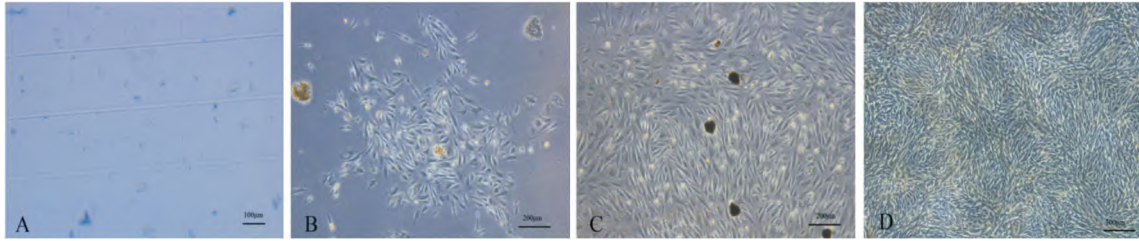
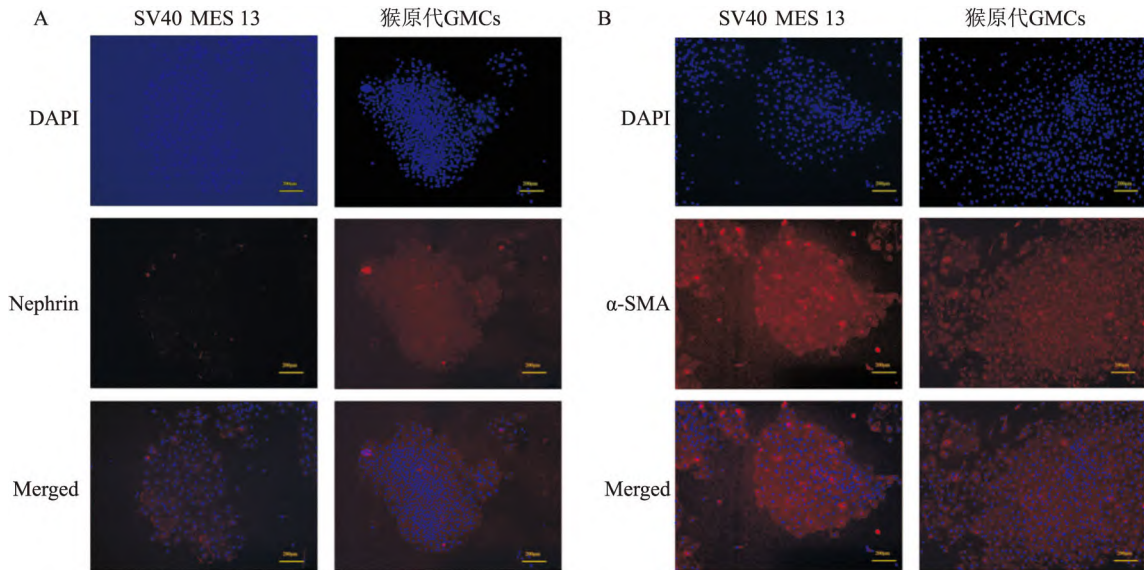


图2 原代 GMCs 形态学

A:肾小球台盼蓝染色( $\times 100$ );B:D14 原代 GMCs 生长情况  $\times 50$ ;C:D21 原代 GMCs 生长情况  $\times 50$ ;D :D28 原代 GMCs 生长情况  $\times 50$

图3 免疫荧光鉴定原代 GMCs Nephrin; $\alpha$ -SMA 蛋白表达  $\times 50$ 

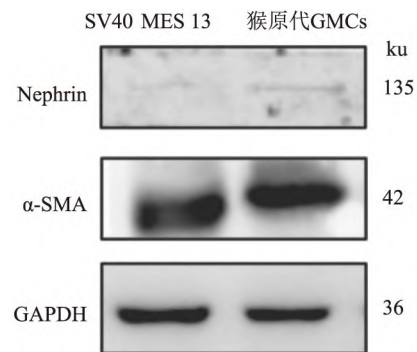
A:原代 GMCs 与 SV40 MES 13 Nephrin 蛋白表达;B 原代 GMCs 与 SV40 MES 13  $\alpha$ -SMA 蛋白表达

囊(肾小球中有细胞散出,但又不破碎)且不着色(图 2A)。原代培养的肾小球 3 d 后开始贴壁。应用倒置显微镜观察显示:培养 7 d 后肾小球周围已有细胞移出,肾小球组织周围出现梭形及星形或不规则形状,细胞胞体中央有一清晰的卵圆形核,胞质向外伸出数个长短不一的突起,处于指数增生期的细胞常呈放射状(图 1A,图 2B)。21 ~ 28 d 原代 GMCs 生长进入旺盛时期,不少地方的细胞汇合,且呈堆叠状生长状态(图 2C ~ D)。

**2.3 原代肾小球系膜细胞 Nephrin 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达** 提取原代 GMCs、SV40 MES 13 蛋白,免疫荧光和 Western blot 法检测细胞中 Nephrin(相对分子量为 135 ku)和  $\alpha$ -SMA(相对分子量为 42 ku)蛋白表达。结果显示,分离培养得到的原代 GMCs  $\alpha$ -SMA 表达水平与对照组 SV40 MES 13  $\alpha$ -SMA 蛋白表达相似;SV40 MES 13 和原代 GMCs 均不表达 Nephrin 蛋白(图 3、4)。

#### 2.4 猕猴肾小球原代系膜细胞功能实验

**2.4.1 TNF- $\alpha$  对猕猴原代肾小球系膜细胞活力以及增殖的影响** 传代后的 GMCs 均匀铺在到 96 孔板中,10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 24 h 后加 CCK-8 检测  $\lambda = 450$  nm 处的吸光度,与 Control 组相比,10 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激组 GMCs 活力提高(图 5B)。图 5C 和 5D 显示高内涵成像系统法检测原代 GMCs 的增殖能力。根据细胞直径最小到最大范围和细胞荧光最弱到最强范围设定软件参数,减去背景荧光强度,统

图4 Western blot 法鉴定原代 GMCs Nephrin; $\alpha$ -SMA 蛋白表达

计分析所有细胞。导出的 Excel 表格,统计每组细胞的细胞总数,分析细胞的增殖能力。与 Control 组相比,原代 GMCs 经 TNF-α 刺激后增殖能力增强(图 5A)。

**2.5 TNF-α 对猕猴原代肾小球系膜细胞迁移的影响** Transwell 小室检测原代 GMCs 迁移功能,利用结晶紫染色后,利用显微镜进行拍照观察记录。与 Control 组相比,TNF-α 刺激后原代 GMCs 迁移数量显著增多(图 6A)。对细胞进行计数统计分析可

知,TNF-α 刺激后原代 GMCs 迁移能力增强(图 6A)。划痕实验检测结果显示,与 Control 组相比,TNF-α 刺激组划痕愈合率增加(图 6B),且差异有统计学意义。

### 3 讨论

胶原酶法和组织黏附法是目前培养原代 GMCs 常用的方法。胶原酶消化法适用于大部分的实验动物,然而组织黏附法只适用于幼年时期的动物,这对

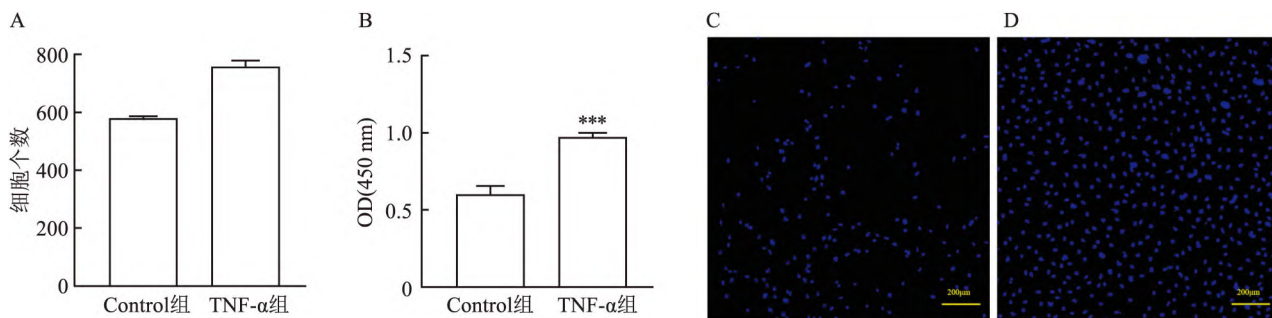


图5 TNF-α对原代 GMCs 活力以及增殖的影响 ×50

A:原代 GMCs 增殖情况统计图( $t=13.648$ );B:原代 GMCs 活力统计图( $t=9.956$ );C:Control 组原代 GMCs 高内涵细胞成像图;D:TNF-α 组高内涵细胞成像图;与 Control 组比较:\*\*\*  $P < 0.001$

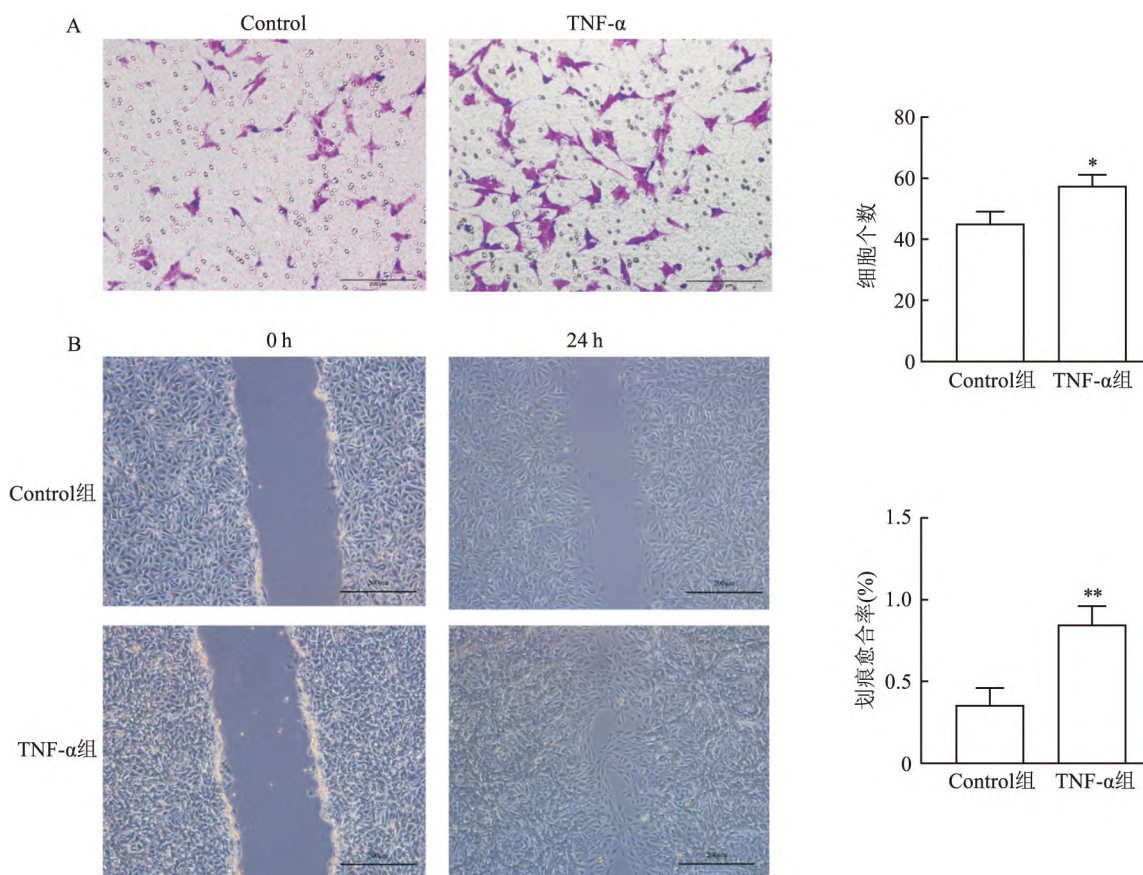


图6 TNF-α对猕猴原代肾小球系膜细胞迁移的影响 ×50

A:两组原代 GMCs 小室迁移;B:两组原代 GMCs 划痕图;与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

实验动物的年龄有限制。本实验利用组织黏附法贴猕猴原代 GMCs,但是未见原代 GMCs 移出,所以结合以上原因,采取了胶原酶消化法获取原代 GMCs。由于不同动物适用的消化条件不同,所以课题组对比了几种不同的消化浓度和时间,根据肾小球活性、贴壁数量、GMCs 贴出的时间和 GMCs 传代后的状态,选出最适合猕猴原代 GMCs 的消化条件(0.1 mg/ml IV型胶原酶消化 10 min)。根据以上结果可知 IV型胶原酶消化浓度过大或者消化时间过长会导致肾小球活性降低,不容易贴出细胞,贴出的细胞生长速度缓慢。0.1 mg/ml IV型胶原酶消化 10 min 细胞生长旺盛,这与已有文献报道的消化浓度相比较低,保持肾小球活性。之前小鼠提取肾小球过程中,需要利用三层筛网才能提取出较纯的肾小球,但是本实验采用了两层筛网便提取出较纯肾小球。在培养过程中,翻转培养瓶的时间很重要,一般为 4~5 h,若时间过短肾小球则未贴壁;过长则导致肾小球组织活性丧失。首次换液时间一般为 3~4 d 且为半定量换液,之后每天观察 GMCs 的移出情况。由于适宜上皮细胞生长的血清浓度为 5%,培养内皮细胞通常需要额外加生长因子,体外培养要求条件与 GMCs 不同,且原代上皮细胞和内皮细胞培养一般需要 5~7 d 传代,而 GMCs 则需要 21~30 d<sup>[11]</sup>。经过以上条件筛选和形态学观察,以及利用免疫荧光和 Western blot 法检测特异性蛋白表达鉴定提取的 GMCs 符合实验要求。本次实验显示,系膜细胞传 5~6 代形态和功能便开始变化,不能支持后续实验。

TNF- $\alpha$  是一种促炎细胞因子,主要由多种免疫细胞(如活化的巨噬细胞、T 淋巴细胞和自然杀伤细胞)产生<sup>[12]</sup>,生理条件下,它具有显著的抗病毒效应,维持机体稳态的作用<sup>[13]</sup>。炎症状态下,TNF- $\alpha$  可以通过 NF- $\kappa$ B 通路导致 GMCs 功能发生改变<sup>[14]</sup>。所以本实验选用 TNF- $\alpha$  为刺激剂,检测猕猴原代 GMCs 功能的变化,经刺激后原代 GMCs 的增殖和迁移能力显著增强,这提示猕猴原代 GMCs 提取成功。

GMCs 是体外研究肾小球疾病的一个很好的实验模型,它存在于肾小球毛细血管袢中,能维持肾小球滤过屏障功能。人类疾病的动物模型对于了解疾病的发生发展机制和治疗干预方式至关重要。人类与非人类灵长类动物各个系统发育具有密切的联系,并且与它们的生理有许多相似之处,例如高度相似的免疫系统以及相似的组织结构等<sup>[15]</sup>。之前无

论是小鼠、大鼠、兔等动物原代 GMCs,都难以完整体现人原代 GMCs 的生理病理功能。本研究以猕猴为实验动物成功探索出非人灵长类动物 GMCs 的分离方法,并对 GMCs 的功能进行了鉴定,为研究肾脏相关疾病提供了一个体外细胞模型。

### 参考文献

- [1] GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. Lancet, 2020, 395(10225): 709–33.
- [2] Ebefors K, Lassén E, Anandakrishnan N, et al. Modeling the glomerular filtration barrier and intercellular crosstalk [J]. Front Physiol, 2021, 12: 689083.
- [3] Scindia Y M, Deshmukh U S, Bagavant H. Mesangial pathology in glomerular disease: targets for therapeutic intervention [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2010, 62(14): 1337–43.
- [4] Wilson H M, Stewart K N. Glomerular epithelial and mesangial cell culture and characterization [J]. Methods Mol Biol, 2012, 806: 187–201.
- [5] Abboud H E. Mesangial cell biology [J]. Exp Cell Res, 2012, 318(9): 979–85.
- [6] 曹英杰,郭乃凤,吕莹,等. 小鼠肾小球系膜细胞的分离、原代培养及鉴定 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(12): 1315–8.
- [7] 尹燕志,张李梅,鞠建伟,等. 人肾小球系膜细胞原代培养方法的改进 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(11): 1939–42.
- [8] Hori Y, Schaeffer D J, Yoshida A, et al. Cortico-subcortical functional connectivity profiles of resting-state networks in marmosets and humans [J]. J Neurosci, 2020, 40(48): 9236–49.
- [9] 翟文生,白洁,王文英,等. 大鼠肾小球系膜细胞体外培养及鉴定的实验研究 [J]. 中医学报, 2011, 26(3): 319–21.
- [10] Liu Y, Yu C, Ji K, et al. Quercetin reduces TNF- $\alpha$ -induced mesangial cell proliferation and inhibits PTX3 production: Involvement of NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Phytother Res, 2019, 33(9): 2401–8.
- [11] Krtić J, Pláteník J, Kazderová M, et al. Culture methods of glomerular podocytes [J]. Kidney Blood Press Res, 2007, 30(3): 162–74.
- [12] Al-Lamki R S, Mayadas T N. TNF receptors: signaling pathways and contribution to renal dysfunction [J]. Kidney Int, 2015, 87(2): 281–96.
- [13] 崔建娇,张莉,王萍,等. 血清肿瘤坏死因子- $\alpha$  与免疫球蛋白 E 在肺结核感染患者中的表达及临床意义 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(7): 1651–3.
- [14] 王伟铭,陈永熙,陈楠. 慢性肾脏病与肾脏纤维化和炎症 [J]. 内科理论与实践, 2007(6): 417–9.
- [15] Pasini E M, Kirkegaard M, Mortensen P, et al. Deep-coverage rhesus red blood cell proteome: a first comparison with the human and mouse red blood cell [J]. Blood Transfus, 2010, 8 Suppl 3 (Suppl 3): s126–39.

## Isolation, culture and identification of glomerular mesangial cells from macaca mulattas

Liu Xiaoyi, Zhang Chunmei, Zhang Lei, Xu Zhen, Wei Qi, Jiang Haifeng,

Dong Tingyu, Yang Xuezhi, Yan Shangxue, Chang Yan, Wei Wei

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Lab of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Rheumatoid Arthritis Research Centre, Anhui Medical University, Hefei 230032*)

**Abstract Objective** To explore a simple, convenient and reproducible method for the *in vitro* extraction, culture and identification of primary glomerular mesangial cells (GMCs) from non-human primate. **Methods** The kidneys of macaca mulattas were removed under aseptic conditions, and the glomeruli were separated using two different pore sizes (between 100 and 200 mesh) and digested with type VI collagenase at different concentrations (0.1 mg/ml and 0.2 mg/ml), and different digestion times (10 min and 15 min) were set for the two concentrations. The growth of GMCs under different digestion conditions was observed in the bottles. The structure of GMCs was observed under microscope and the expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and Nephryn in GMCs was detected by immunofluorescence and Western blot. The biological properties of GMCs were observed after stimulation with tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and the viability and proliferation of GMCs were detected by CCK-8 and High Connotation Cell Imaging System, respectively and the migration ability of GMCs was detected by Transwell and cell scratch assay. **Results** The glomeruli collected using 0.1 mg/ml type VI collagenase digestion for 10 min were more apposed and the glomeruli cells were in a better growth state. Glomeruli in primary culture were adherent at 3 d. Irregularly shaped or star-shaped cells began to migrate at 7 d. GMCs gradually spread to the bottom of the bottle after 21 ~ 35 d. GMCs were positive for  $\alpha$ -SMA protein and negative for Nephryn protein. 10 ng/ml TNF- $\alpha$  *in vitro* stimulation significantly enhanced the proliferation and migration ability of GMCs. **Conclusion** The method of collagenase digestion (0.1 mg/ml type VI collagenase digestion for 10 min) was successfully established for the isolation and culture of GMCs, which can provide a suitable cell model to better simulate human kidney diseases in the future.

**Key words** macaca mulattas; primary glomerular mesangial cells; primary cell culture; collagenase digestion method

(上接第 1221 页)

gastric cancer patients after surgery, and to analyze whether ATRA affects the proliferation, migration, invasion and apoptosis of gastric cancer cells by regulating epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods** A total of 198 patients with gastric cancer after surgery were selected and divided into control group and ATRA group, and the difference in survival time between the two groups was compared. MGC-803 gastric cancer cells were cultured *in vitro* and divided into control group and ATRA group. The proliferation ability was detected by CCK-8 experiment, the migration ability was detected by cell scratch experiment, the invasion ability was detected by Transwell experiment, and the apoptosis was detected by flow cytometry. The expressions of EMT-related genes (E-cadherin, N-cadherin and Vimentin) were detected by Western blot, RT-qPCR and immunofluorescence. **Results** ATRA could prolong the survival time of patients after gastric cancer surgery. After ATRA treatment, the proliferation, migration and invasion abilities of gastric cancer cells decreased, and the apoptosis of gastric cancer cells was promoted at the same time. Western blot, RT-qPCR and immunofluorescence results showed that ATRA down-regulated the expression levels of N-cadherin and Vimentin and up-regulated the expression level of E-cadherin in gastric cancer cells.

**Conclusion** ATRA can prolong the survival time of gastric cancer patients after surgery, promote the apoptosis of gastric cancer cells, and inhibit the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by regulating EMT.

**Key words** all-trans-retinoic acid; stomach neoplasms; prognostic correlation; EMT