

本文引用: 胡明, 刘永霞, 韩春光, 等. 原代培养大鼠肾小管上皮细胞在有机阴离子转运中的应用[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(4): 244-247, 252.

【基础研究】

原代培养大鼠肾小管上皮细胞在有机阴离子转运中的应用

胡明^{1,2}, 刘永霞³, 韩春光¹, 邸婵娟¹, 马聪¹, 王恺¹, 虞积耀^{1,2}, 刘永学¹

(1. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850; 2. 海军总医院海战伤救治研究中心, 北京 100048; 3. 潍坊市第六人民医院内科, 山东 潍坊 261021)

摘要: **目的** 优化原代培养大鼠肾小管上皮细胞(RTEC)的方法, 探讨其应用于有机阴离子转运分析研究的优点。**方法** 将大鼠肾皮质剪碎, 经消化、过滤、短暂贴壁, 所得大鼠 RTEC 在含体积分数 10% 胎牛血清的达尔伯克改良伊格尔培养基/F12 培养基中培养, 同时加入胰岛素-转铁蛋白-硒(ITS)营养添加剂。人肾小管 HK-2 细胞的培养条件同大鼠 RTEC, 但不添加 ITS。反转录聚合酶链反应法检测大鼠 RTEC 及人肾小管 HK-2 细胞中 β -actin、 α -酮戊二酸(盐)受体 1 及有机阴离子转运蛋白 1(OAT1)mRNA 的表达。将 HK-2 细胞、大鼠 RTEC 应用于荧光素转运实验, 观察 2 种细胞荧光强度随时间变化的差异。**结果** 大鼠 RTEC 可传代, 且生长状态良好。HK-2 细胞无 OAT1 表达, 不具有转运荧光素的能力; 大鼠 RTEC 有 OAT1 表达, 具有转运荧光素的能力。**结论** ITS 营养添加剂有利于原代培养大鼠 RTEC 的传代生长, 该细胞可成功用于有机阴离子转运的研究, 较 HK-2 细胞株更能客观地反映肾小管的转运功能, 是研究肾脏相关功能的理想细胞学模型。

关键词: 肾小管上皮细胞; HK-2 细胞; 有机阴离子转运; 荧光素

中图分类号: Q813.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2014)04-0244-05

Application of primary cultured renal tubular epithelial cells of rats in research of organic anion transport

HU Ming^{1,2}, LIU Yong-xia³, HAN Chun-guang¹, DI Chan-juan¹, MA Cong¹, WANG Kai¹, YU Ji-yao^{1,2}, LIU Yong-xue¹

(1. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2. Naval Battle Wound Care and Treatment Research Center, Navy General Hospital, Beijing 100048, China; 3. Department of Internal Medicine, the Sixth People's Hospital of Weifang City, Weifang 261021, Shandong Province, China)

Abstract: **Objective** To improve the culture condition of primary renal tubular epithelial cells (RTEC) of rats, and explore the advantage of their usage in experiments of organic anion transport. **Methods** Rat kidney cortices were cut into small pieces, digested and filtered. After a short of period of adherence, the RTEC were cultured in Dulbecco's modified eagle medium/F12 medium (DMEM/F12) with 10% (volume fraction) fetal bovine serum supplemented with insulin-transferrin-selenium (ITS). Human kidney cells HK-2 were cultured in DMEM/F12 medium with 10% (volume fraction) fetal bovine serum. β -actin, α -oxoglutarate receptor 1 (OXGR1) and organic anion transporter 1 (OAT1) mRNA expressions in human kidney cells HK-2 or rat RTEC were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction method. Differences of fluorescence intensity in HK-2 cells or RTEC were observed at different time points to study fluorescein transport in these cells. **Results** Rat RTEC could be passaged, and grew in a good manner. OAT1 expression could be detected in HK-2 cells, HK-2 cells had no transportation ability of fluorescein. OAT1 expression could be detected in rat RTEC, rat RTEC had the transportation ability of fluorescein. **Conclusions** ITS is necessary for primary cultured rat RTEC to passage and proliferate properly, and primary cultured rat RTEC could be used in the study of organic anion transport. Compared with HK-2 cells, primary cultured rat RTEC can reflect objectively the renal tubular transport function, is an ideal cytology model to study the function of kidney-related functions.

Key words: renal tubular epithelial cell; HK-2 cell; organic anion transport; fluorescein

DOI: 10.7683/xyxyxb.2014.04.002

收稿日期: 2014-01-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30973575)

作者简介: 胡明(1970-), 男, 辽宁朝阳人, 博士, 主治医师, 研究方向: 病理学与病理生理学。

通信作者: 虞积耀(1943-), 男, 北京人, 硕士, 主任医师, 教授, 研究方向: 病理学与病理生理学; 刘永学(1966-), 男, 山东安丘人, 博士, 研究员, 研究方向: 受体药理与病理生理学。

肾脏具有清除体内代谢产物及某些毒物的功能,同时还可对水及部分营养物质进行重吸收。肾小管上皮细胞 (renal tubular epithelial cells, RTEC) 的离子转运功能在其中发挥十分重要的作用。由于 RTEC 的离子转运功能,使外源性物质或代谢产物易于在这些细胞中积聚,因而肾小管常常成为肾毒性化合物的作用靶部位^[1]。原代培养细胞及永生细胞系常被用作某种细胞功能研究的实验对象。例如,肾上皮细胞模型常用于研究肾脏毒性的生物化学和功能特点^[2]。HK-2 细胞系源于正常的男性成人肾近曲小管上皮细胞,通过转染人乳头状瘤病毒-16 E6/E7 基因而得以永生,可用于肾上皮细胞功能的体外研究。但是,永生细胞系仅能在某些方面或功能上模拟特定来源的细胞^[3],而且细胞系的长期体外培养及病毒转染可能造成细胞的某些特性的丢失;有学者认为,几乎没有一种细胞系能够保持原代细胞的基本特征^[4]。原代培养的肾上皮细胞则可较完善地保存细胞的原有特性,从而更客观地反映肾小管细胞的功能。本研究旨在观察 HK-2 细胞系和原代培养大鼠 RTEC 的差别,分析二者在研究肾小管上皮细胞转运功能中的意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物 二级雄性 Wistar 大鼠 20 只,体质量 (180.2 ± 20.1) g,由军事医学科学院实验动物中心提供并饲养,室内温度 21 ~ 23 ℃,相对湿度 60%。

1.2 主要试剂及配制 反转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;胶原酶 I、脱氧核糖核酸酶均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;达尔伯克改良伊格尔培养基/F12 培养基 (Dulbecco's modified eagle medium/F12, DMEM/F12)、胰岛素-转铁蛋白-硒 (insulin-transferrin-selenium, ITS) 添加剂购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;荧光素钠购自国药集团化学有限公司。将胎牛血清与 DMEM/F12 按 1 : 10 (体积比) 配制培养液,然后按 1 : 100 (体积比) 加入 ITS 辅助营养剂,以 56 g · L⁻¹ 碳酸氢钠溶液调整 pH 至 7.2。

1.3 大鼠肾小管分离与原代细胞培养 雄性 Wistar 大鼠,实验前 12 h 禁食,自由饮水。250 g · L⁻¹ 氨基甲酸乙酯对大鼠进行肌肉注射麻醉,给药剂量为 2 g · kg⁻¹ 体质量。将大鼠腹卧位固定于解剖盘中,用碘酒消毒后,剪去皮肤。体积分数 75% 乙醇消毒筋膜 5 min 后,将大鼠移到超净台上。剪开背部筋膜及肌肉,无菌取双肾,立即置于 4 ℃ Hank's 平衡盐溶

液 (Hank's balanced salt solution, HBSS) 中。仔细去除肾蒂及包膜,剪取薄层肾皮质,剪碎至 1 mm × 1 mm × 1 mm。4 ℃ HBSS 洗 3 遍。800 r · min⁻¹ 离心 2 次,每次 4 min,去除上清,以尽量去除杂质细胞。加入终浓度为 2 g · L⁻¹ 的 I 型胶原酶及 0.1 g · L⁻¹ 的脱氧核糖核酸酶,混匀,37 ℃ 振荡消化 30 min。将消化后的组织碎块转移至 80 目不锈钢网上,过滤并用 DMEM/F12 培养基冲洗。网下液体再经 170 目细胞筛过滤。冲洗 3 次;冲洗液量要大,以便去除杂细胞。将细胞筛翻转,用含体积分数 10% 胎牛血清及 ITS 的 DMEM/F12 培养基将细胞筛上附着的肾小管节段冲洗到培养皿中。注意将细胞筛上附着的细胞仔细地冲洗下来。此时显微镜下观察可见大量肾小管节段漂浮在培养液中。这样分离得到的肾小管上皮细胞有时会混有少许杂细胞,可在 37 ℃ 体积分数 5% CO₂ 孵箱中静置培养约 5 h,然后将培养液吸出,换入新的培养瓶中。在新培养瓶中的肾小管细胞 2 d 后换液。原代培养 4 ~ 5 d 后细胞长满,0.5 g · L⁻¹ 胰蛋白酶消化,待细胞变圆后吸去胰蛋白酶,加入含体积分数 10% 胎牛血清及 ITS 的 DMEM/F12 培养液终止消化,传代后继续培养。

1.4 人 HK-2 细胞系及其培养 HK-2 细胞系购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。HK-2 细胞复苏后,用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液在 37 ℃ 培养箱中培养,每 2 ~ 3 d 以 2.5 g · L⁻¹ 胰蛋白酶消化后进行传代。

1.5 RT-PCR 法检测细胞中相关基因 mRNA 的表达 将大鼠 RTEC 细胞或人 HK-2 细胞接种在 6 孔板中,使细胞浓度达 1 × 10⁷ L⁻¹,每孔接种 3 mL。培养 72 h 后提取总 RNA;反转录后用 PCR 法扩增 β-actin、α-酮戊二酸 (盐) 受体 1 (oxoglutarate receptor 1, OXGR1) 及有机阴离子转运蛋白 1 (organic anion transporter 1, OAT1) mRNA 的表达,PCR 反应条件: 95 ℃ 30 s, 58 ℃ 45 s, 72 ℃ 30 s;最后 72 ℃ 延伸 5 min。其中, RTEC 进行 28 个循环, HK-2 细胞进行 38 个循环。扩增完毕,以 15 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳鉴定目的基因的表达情况。各基因的引物序列见表 1 和表 2。

表 1 原代大鼠 RTEC 的 RT-PCR 中使用的引物序列
Tab.1 Primer sequences for RT-PCR analysis of primary rat RTEC

基因	引物序列 (5'→3')
β-actin	S:TCATGAAGTGTGACGTTGAC
	AS:CCTAGAAGCATTTGCCGTGC
OXGR1	S:ACTCTGCTACAGCAGATT
	AS:GCCTGCTGGAAGTTATTG
OAT1	S:AGAGTCACAGACCCCTGC
	AS:GCCCAGGCTGTAGACATAGC

表 2 HK-2 细胞 RT-PCR 中使用的引物序列

Tab.2 Primer sequences for RT-PCR analysis of HK-2 cells

基因	引物序列 (5'→3')
β-actin	S: AGCGAGCATCCCCAAAGTT AS: GGGCAGCAAGGCTCATCATT
OXGR1	S: CCCTTGCTGATAGTGACAC AS: AAGTTGTCGCTGACGACCAC
OAT1	S: CCGGCTGGCACTCCTCTCCGGGAG AS: GTAGAGCTCGGCAGTCATGCTCACCA

1.6 培养细胞的荧光素转运实验 将培养在 6 孔板中的大鼠原代 RTEC 或 HK-2 细胞消化后制成细胞悬液。1 080 r · min⁻¹ 离心 1 min, 弃上清。在离心管中分别加入含 1 μmol · L⁻¹ 荧光素的孵育液。37 °C 培养箱孵育 5 min。取出后 1 080 r · min⁻¹ 离心 1 min, 弃上清。加入 0 °C 预冷的孵育液 1 mL, 充分混匀后, 1 080 r · min⁻¹ 离心 1 min, 弃上清; 再进行 1 次清洗。余下的 20 μL 孵育液涂片。在荧光显微镜下观察、记录细胞内荧光强度的变化。使用 Image-pro Plus 6.0 对荧光图像进行分析。经过背景校正后, 将测得的平均积分光密度作为荧光强度值。将细胞内的不同时间点荧光强度与时间零点的荧光强度进行比较, 计算比值, 比较荧光强度的变化。

1.7 统计学处理 应用 SAS 9.2 统计软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HK-2 细胞中相关基因 mRNA 的表达 结果见图 1。RT-PCR 结果显示, HK-2 细胞中有明显的 β-actin、OXGR1 mRNA 表达, 其中 β-actin mRNA 表达较强, 而 OXGR1 mRNA 略弱; 但无 OAT1 mRNA 的明确表达。

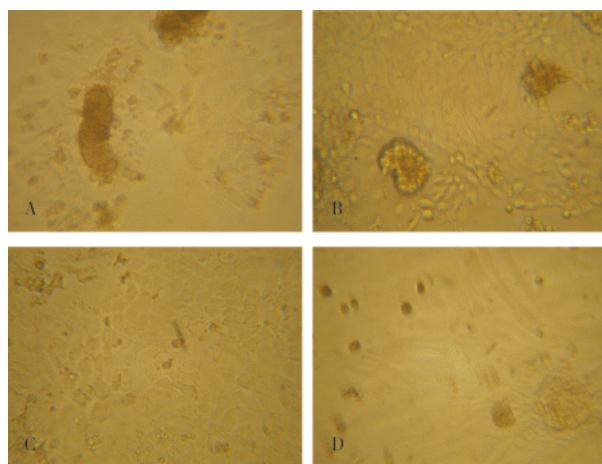


图 1 HK-2 细胞中 β-actin、OXGR1 及 OAT1 mRNA 的表达

Fig.1 Expression of β-actin, OXGR1 and OAT1 mRNA in HK-2 cells

2.2 原代培养大鼠 RTEC 的生长特点及 ITS 的影响 在培养皿中原代培养的 RTEC 初始时尚混有杂细胞及细胞碎片。培养约 5 h 将细胞从培养皿移至新培养瓶中后, 杂细胞明显减少, 成纤维细胞等杂细胞或蛋白碎片因更易于贴壁而被去除。经形态学观察, 培养瓶中约 95% 均为肾小管节段或 RTEC。如图 2 所示, 近端小管细胞 12 h 起即可贴壁。24 ~ 36 h 后可见上皮样细胞以贴壁的节段为中心, 向外

周爬出, 使得此时培养瓶中细胞的整体形态呈现岛屿状。2 d 后更换培养液, 第 4 ~ 7 天是对数生长期, 6 ~ 7 d 细胞的融合率达到 90% 以上。显微镜下观察细胞体积较大, 呈多边形铺路石样, 折光性较强, 细胞质透明。原代培养的 RTEC 一般在传代 7 ~ 9 代后出现老化、死亡。如果培养液中缺乏 ITS 添加剂, 则细胞会在消化传代后继续培养时出现凋亡。



A: 12 h; B: 36 h; C: 6 d; D: ITS 缺乏导致原代培养大鼠 RTEC 凋亡。

图 2 不同时间及培养条件下大鼠 RTEC 原代培养的形态 (×200)

Fig.2 Appearance of primary rat RTEC on different time points or in different culture media (×200)

2.3 原代培养大鼠 RTEC 中相关基因 mRNA 的表达 结果见图 3。RT-PCR 结果显示, 原代大鼠 RTEC 中有明显的 β-actin、OXGR1 及 OAT1 mRNA 表达。

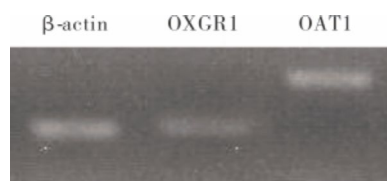
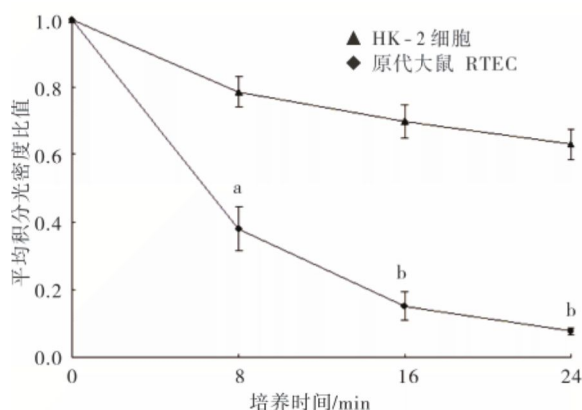


图 3 大鼠原代 RTEC 中 β-actin、OXGR1 及 OAT1 mRNA 的表达

Fig.3 Expression of β-actin, OXGR1 and OAT1 mRNA in primary rat RTEC

2.4 2 种细胞荧光素转运功能的比较 结果见图 4。荧光素转运实验显示, 随着孵育时间的延长, HK-2 细胞中的荧光强度仅有轻微减弱; 与之对比, 大鼠原代肾小管上皮中的荧光强度则随着时间的延长而明显减弱。二者荧光强度变化的比值, 在 8 min 时差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 在 16、24 min 时差异有极显著统计学意义 ($P < 0.01$)。HK-2 细胞几乎丧失转运能力, 原代大鼠 RTEC 则具备良好的转运功能。



与 HK-2 细胞比较^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

图4 HK-2 细胞与原代大鼠 RTEC 中荧光强度变化

Fig.4 Change of fluorescent intensity in HK-2 cells and primary rat RTEC

3 讨论

OXGR1 原称 GPR80 或 GPR99, 曾是多年来引人关注的孤儿 GPCR 成员之一。后来证实, α -酮戊二酸盐是该受体的内源性配基^[5]。OXGR1 在机体内分布并不广泛, 主要分布于肾脏、睾丸和胚胎等组织, 在其他组织中表达甚微或不表达^[6]。在正常的肾组织中, 该受体在肾小管中高表达^[7]。甚至有学者认为 OXGR1 几乎只在肾脏有明显表达^[8]。因而, 可将 OXGR1 在某种程度上作为肾小管上皮细胞的生物标志物。本实验结果显示, RTEC 与 HK-2 2 种细胞均表达 OXGR1 mRNA, 符合 OXGR1 的组织表达特点。

OAT1 是溶质载体家族 22 成员, 在人^[9]和大鼠^[10]的肾小管上皮细胞膜的底侧面表达。OAT1 在肾脏的主要生理功能表现在尿液形成过程中, 它可将有机阴离子从肾小管的管周间隙, 逆电化学梯度, 经基底膜转运到肾小管上皮细胞中; 随后有机阴离子再由这些细胞内, 顺电化学梯度, 排出到肾小管中形成尿液^[11]。OAT1 在有机阴离子、毒素、药物的转运、排出中起着十分重要的作用, 而转运功能是肾脏的重要功能之一。本实验证实, HK-2 细胞系出现了 OAT1 表达消失的缺陷; 经分析认为这可能是由于国内的 HK-2 细胞多经过较长时间的传代, 离体时间长而出现了退化的现象。失去 OAT1 的 HK-2 细胞系不适合作为研究肾小管功能的细胞模型, 作为肾毒性化合物的研究模型也存在一定的不足。

为此, 本实验选用原代培养的大鼠 RTEC 进行研究。本实验方法中, 将大鼠肾组织剪成小块后消化; 随后用 80 及 170 目的细胞筛进行冲洗分离, 以便有效去除肾小球及其他杂质^[12]。分离后得到细胞悬液, 在培养皿中 37 °C 培养 5 h 后, 再转移至新的培养瓶中, 以去除杂细胞等其他成分, 因为这些成

分较 RTEC 更容易贴附于培养瓶壁。

仅使用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液进行原代细胞培养, 结果虽然早期细胞贴壁生长良好, 但是在消化传代后很快就出现凋亡。随后, 在培养液中添加了 ITS 辅助营养剂, ITS 辅助营养剂含胰岛素 $0.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 人转铁蛋白 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 硒酸钠 $0.55 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。原代培养的大鼠 RTEC 可在添加了 ITS 的培养液中传代生长 7 ~ 9 代, 且生长形态保持良好。胰岛素对 3 大物质的代谢均有影响, 它可促进细胞对葡萄糖的摄取及糖原的合成, 增加氨基酸转运进入细胞和蛋白合成的速度, 促进脂肪酸的生成^[13]。转铁蛋白可增加细胞内 DNA 的水平, 加快细胞的增殖速度^[14]。硒是构成硒半胱氨酸、硒蛋氨酸等氨基酸的必需成分, 后者参与构成谷胱甘肽过氧化酶等机体中重要的酶; 研究发现硒具有抗感染、抗氧化及抑制 DNA、染色体断裂的作用^[15]。在本实验中, ITS 可明显促进细胞的增殖及其对营养物质的吸收, 并且对细胞有一定的保护作用, 这样在传代后 RTEC 可保持足够的细胞密度, 有利于细胞的贴附。因而添加了 ITS 的 DMEM/F12 培养液更适宜于 RTEC, 有助于细胞在消化传代后仍能保持良好的生长, 为完成后续的实验提供了条件。而缺乏 ITS 的培养液, 则会造成 RTEC 细胞传代后在新培养瓶中的细胞数目没有明显的增加, 导致细胞不能很好地融合贴壁, 随后出现细胞凋亡。

原代培养的大鼠 RTEC 经 RT-PCR 检测发现有 OAT1 表达, 说明本研究中所采取的原代培养方法可较好地保存 RTEC 细胞膜上的重要结构。荧光素是研究肾小管转运功能很好的标志物, 它可在肾小管细胞内积聚或排出^[16]。荧光素进出肾小管细胞质内的机制与经典的有机阴离子的转运机制相一致^[17]。荧光素是 OAT1 的底物之一, OAT1 可将荧光素逆浓度梯度转运至细胞内^[18]。应用 HK-2 细胞及原代 RTEC 进行荧光素转运实验, 发现 HK-2 细胞内的荧光强度基本不变, 而原代培养大鼠 RTEC 内的荧光强度则可快速减弱。实验提示 RTEC 中的荧光素被排出细胞外, 这是 RTEC 细胞内外的荧光素浓度差造成的结果, 说明 RTEC 具有通过 OAT1 转运有机阴离子的功能; 而 HK-2 细胞内外的荧光素水平基本没有差异, 不具备转运有机阴离子的作用, 这源于 HK-2 细胞中 OAT1 表达的缺失。

本研究采用的原代培养大鼠 RTEC 的方法, 更完整地保持了细胞的重要结构和功能, 可以作为研究肾小管上皮细胞功能, 特别是转运功能的细胞学模型。此外, 该模型还可用于在细胞水平或亚细胞水平上研究肾毒性化合物的特性及影响因素。

(下转第 252 页)

参考文献:

- [1] 邢雪琨,武红艳.血清对脐带间充质干细胞体外培养的影响[J].新乡医学院学报,2012,29(12):896-899.
- [2] 杨桂鲜.间充质干细胞移植治疗系统性红斑狼疮研究进展[J].国际泌尿系统杂志,2011,31(4):552-554.
- [3] 高飞,袁正伟.骨髓间充质干细胞在先天性脊椎裂胎鼠脊髓中的分化[J].实用儿科临床杂志,2012,27(11):870-872,888.
- [4] 王昭霞,邹亚伟,李敏敏,等.急性淋巴细胞白血病患儿骨髓间充质干细胞对 K562 和 K562/A02 细胞耐药的影响[J].实用儿科临床杂志,2012,27(19):1507-1510.
- [5] 秦力维,高原,郭建巍.间充质干细胞治疗眼免疫性疾病的新进展[J].眼科新进展,2013,33(9):890-893.
- [6] 邵毅,余静,余瑶,等.无缝线骨髓间充质干细胞羊膜移植预防角膜缘干细胞缺乏的实验研究[J].眼科新进展,2013,33(11):1011-1015.
- [7] 袁冬妹,周敦华.间充质干细胞对 GVHD 及 GVL 作用机制的研究进展[J].广东医学,2011,32(7):929-932.
- [8] Bruno S, Collino F, Deregibus M C, et al. Microvesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells inhibit tumor growth[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(5):758-771.
- [9] Goldstein R H, Reagan M R, Anderson K, et al. Orthotopic breast cancer tumors and promote bone human bone marrow-derived mscs

can home to metastasis [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(24):10044-10050.

- [10] Tian L L, Yue W, Zhu F, et al. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cell Physiol*, 2011, 226(7):1860-1867.
- [11] Loeblinger M R, Eddaoudi A, Davies D, et al. Mesenchymal stem cell delivery of trail can eliminate metastatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(10):4134-4142.
- [12] Khakoo A Y, Pati S, Anderson S A, et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(5):1235-1247.
- [13] Zhu Y, Sun Z, Han Q, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1 [J]. *Leukemia*, 2009, 23(5):925-933.
- [14] Qiao L, Xu Z L, Zhao T J, et al. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling [J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(1):67-77.
- [15] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4):315-317.

(本文编辑:王 燕 英文编辑:王 燕)

(上接第 247 页)

参考文献:

- [1] Schaaf G J, de Groene M, Maas F, et al. Characterization of bio-transformation enzyme activities in primary rat proximal tubular cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2001, 134(2):167-190.
- [2] Lash L H, Putt D A, Zalups R K. Biochemical and functional characteristics of cultured renal epithelial cells from uninephrectomized rats: factors influencing nephrotoxicity [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 296(2):243-251.
- [3] van Kooten C, Lam S, Dahan M R. Isolation, culture, characterization and use of human renal tubular epithelial cells [J]. *J Nephrol*, 2001, 14(3):204-210.
- [4] 白蓉,唐辛,徐进,等.小鼠肾小管上皮细胞的原代培养及生物学特性[J].新乡医学院学报,2013,30(8):593-597.
- [5] He W, Miao F J, Lin D C, et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors [J]. *Nature*, 2004, 429(6988):188-193.
- [6] 袁广胜,潘光堂,吴芳明,等.孤儿 G 蛋白偶联受体 hGPCRc 的亚细胞定位及组织分布[J].生物工程学报,2005,21(3):365-369.
- [7] Wittenberger T, Hellebrand S, Munck A, et al. GPR99, a new G protein-coupled receptor with homology to a new subgroup of nucleotide receptors [J]. *BMC Genomics*, 2002, 3(1):17.
- [8] Deen P M, Robben J H. Succinate receptors in the kidney [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(8):1416-1422.
- [9] Motohashi H, Sakurai Y, Saito H, et al. Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(4):866-874.
- [10] Kojima R, Sekine T, Kawachi M, et al. Immunolocalization of mul-

tispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in rat kidney [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(4):848-857.

- [11] Jennifer L P, Neetu D R, Laura A H, et al. A three - dimensional model of human organic anion transporter 1 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(49):38071-38079.
- [12] Liu B, Preisig P A. Compensatory renal hypertrophy is mediated by a cell cycle-dependent mechanism [J]. *Kidney Int*, 2002, 62(5):1650-1658.
- [13] Newsholme E A, Dimitriadis G. Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001, 109(Suppl 2):122-134.
- [14] Silvestroff L, Franco P G, Pasquini J M. Neural and oligodendrocyte progenitor cells: transferrin effects on cell proliferation [J]. *ASN Neuro*, 2013, 5(1):e00107.
- [15] Ferguson L R, Karunasinghe N, Zhu S, et al. Selenium and its' role in the maintenance of genomic stability [J]. *Mutat Res*, 2012, 733(1/2):100-110.
- [16] Terlouw S A, Tanniseven O, Russel F G M, et al. Metabolite anion carriers mediate the uptake of the anionic drug fluorescein in renal cortical mitochondria [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 292(3):968-973.
- [17] Sullivan L P, Grantham J A, Rome L, et al. Fluorescein transport in isolated proximal tubules *in vitro*: epifluorometric analysis [J]. *Am J Physiol*, 1990, 258(1 Pt 2):46-51.
- [18] Dantzer W H, Wright S H. The molecular and cellular physiology of basolateral organic anion transport in mammalian renal tubules [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1618(2):185-193.

(本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)