

永生化小鼠 Bend. 3 细胞株 具有脑微血管内皮细胞的屏障特性

何芳 尹飞 彭镜 李孔昭 吴丽文 邓小鹿

(中南大学湘雅医院儿科,湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 评价永生化小鼠脑微血管内皮细胞株 Bend. 3 是否具有脑微血管内皮细胞的屏障特性。方法 将小鼠脑微血管内皮细胞株 Bend. 3 接种于细胞培养插内,跨内皮细胞电阻抗(transendothelial electrical resistance, TEER)和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)通透性实验检测其屏障功能。Western blot 法和直接荧光染色法观察其紧密连接相关蛋白 Occludin、ZO-1 的表达及细胞骨架蛋白 F-actin 的分布。结果 Bend. 3 细胞的 TEER 随培养时间延长逐渐升高,10 d 达 $82.3 \pm 6.0 \Omega \cdot \text{cm}^2$,与培养 3 d 时的 $37.3 \pm 3.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其培养 10 d 和 3 d 的平均 HRP 通透率在 120 min 分别为 $(2.2 \pm 0.05)\%$ 和 $(4.3 \pm 0.20)\%$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。培养 10 d 时该细胞表达高浓度的紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1,且 F-actin 主要分布在细胞周边,线条完整连续,未见明显缝隙形成。结论 小鼠脑微血管内皮细胞株 Bend. 3 具有脑微血管内皮细胞的屏障特性,且其屏障功能在接种 10 d 后可达到最理想的状态。[中国当代儿科杂志,2010,12(6):474-478]

[关键词] 屏障;紧密连接;脑微血管内皮细胞株;小鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)06-0474-05

Immortalized mouse brain endothelial cell line Bend. 3 displays the comparative barrier characteristics as the primary brain microvascular endothelial cells

HE Fang, YIN Fei, PENG Jing, LI Kong-Zhao, WU Li-Wen, DENG Xiao-Lu. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Yin F, Email: yf2323@hotmail.com)

Abstract: Objective The purpose of this study was to assess whether the immortalized mouse brain endothelial cell line Bend. 3 displays the comparative barrier characteristics as the primary brain microvascular endothelial cells (BEMC). **Methods** Immortalized mouse brain endothelial cell line, Bend. 3 cells were cultured in transwell inserts and their restrictive characteristics were assessed by transendothelial electrical resistance (TEER) and horseradish peroxidase (HRP) permeability assays. Western blot and direct fluorescent staining methods were used to detect the tight junction protein expression and F-actin distribution. **Results** The TEER in Bend. 3 cells increased with the prolonged culture time and increased to $82.3 \pm 6.0 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 10 days after culture, which was significantly higher than that 3 days after culture ($37.3 \pm 3.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$; $P < 0.05$). There were significant differences in the permeability rates for HRP 3 and 10 days after culture [$(4.3 \pm 0.20)\%$ vs $(2.2 \pm 0.05)\%$] ($P < 0.05$). Western blot indicated high level expression of tight junction proteins occludin and ZO-1 in Bend. 3 cells 10 days after culture. F-actin was visualized around the cell membrane and presented scrobiculate linear fluorescence 10 days after culture. **Conclusions** Bend. 3 cells have similar barrier characteristics to BEMC, and their barrier function may reach to the best effect 10 days after culture.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (6):474-478]

Key words: Barrier; Tight junction; Brain microvascular endothelial cell line; Mice

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)是存在于血管和脑之间的一种选择性地阻止某种物质由血入脑的“屏障”,对维持脑内环境恒定,保障中枢神经系统的正常活动具有重要意义^[1]。要深入研究血脑屏障的功能与调控机制,构建一种简单可靠、接近在体状态的体外 BBB 细胞模型至关重要。脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cell, BMEC) 是构成 BBB 屏障的最主要成分及结构基础^[2],因此目前大多数 BBB 模型利用原代培养的脑微血管内皮细胞构建而成^[3-4]。然而随着对 BBB 功能的深入研究,BEMC 生长周期长、体外培养传代数代即失去特性的特点限制了研究人员采用如稳定转

[收稿日期]2009-09-29;[修回日期]2009-12-02
[基金项目]本研究由国家自然科学基金资助,基金号为 30872790。
[作者简介]何芳,女,博士研究生。
[通信作者]尹飞,教授。

染等新的分子生物学技术对 BBB 各类信号通路进行研究,同时 BMEC 体外培养代数有限、不能完全排除杂细胞污染的缺陷使得利用 BEMC 进行 BBB 体外调控研究的结果稳定性较差。为了弥补上述原代细胞在 BBB 调控和分子信号机制研究方面的缺点,有人提出了利用永生化的细胞替代原代细胞,并进行了许多尝试性研究。目前在国内被广泛采用的是利用 ECV304 细胞株替代原代脑微血管内皮细胞建立体外血脑屏障细胞模型^[5]。虽然该细胞排除了上述原代培养细胞的缺点,但其非内皮细胞来源,在生长过程中表现出膀胱癌上皮的特征,不能真实反映各种实验条件下作为 BBB 主要成分的内皮细胞的病理生理过程。而国外目前已报道的一系列内皮细胞系如 RBE4、SV-HCEC 等,与原代细胞相比其 TEER 值低得多,提示它们未有足够紧密的细胞旁屏障作用^[6],不适合用于血脑屏障紧密连接的研究。以前有报道永生化小鼠脑微血管内皮细胞株 Bend. 3 具有较好的细胞旁屏障功能^[7]。因此本研究运用跨内皮细胞电阻抗 (transendothelial electrical resistance, TEER) 和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 通透性实验检测 Bend. 3 的屏障功能; Western blot 法和直接荧光染色法检测其紧密连接相关蛋白 Occludin、ZO-1 的表达及细胞骨架蛋白 F-actin 的分布状态,以评价 Bend. 3 细胞是否存在与原代培养的 BMEC 一致的屏障功能和生理特性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

小鼠脑微血管内皮细胞株 Bend. 3 (美国芝加哥大学章坚教授馈赠), 细胞培养插 (Corning, 0.4 μm 孔径, 24 孔板, 美国), Millicell-ESR 电阻仪 (Millipore, 日本), 胎牛血清 (Gibico, 美国), 兔抗鼠 occludin 一抗 (Santa Cruz, 美国), 兔抗鼠 ZO-1 一抗 (Santa Cruz, 美国), 鼠抗兔 tublin 一抗 (Santa Cruz, 美国), 罗丹明-鬼笔环肽 (Invitrogen, 美国), 其余生化试剂均为进口分装或国产分析纯试剂。

1.2 Bend. 3 细胞培养

培养基为完全培养基 (4.5 g/L 葡萄糖, 3.7 g/L 碳酸氢钠, 4 mM 谷氨酰胺, 10% 胎牛血清), 在 5% CO₂, 37℃ 培养箱中培养, 约 3 d 传代一次。每次以 1 × 10⁴ 个/ml 的密度将 Bend. 3 细胞悬液 0.3 mL 接种于细胞培养插内池, 并于 24 孔板培养插外池加入完全培养基 1.2 mL, 保证培养插内外池两侧液面相等, 倒置相差显微镜下每日观察 Bend. 3 细胞形态变化。

1.3 Bend. 3 细胞屏障功能检测

1.3.1 TEER 的测定 从细胞接种入细胞插内开始, 以未接种细胞仅在细胞插内加入等量相同培养基的样品为空白对照, 利用 ESR-电阻仪每天测量细胞 TEER 读数。为保证数值的准确性, 整个过程在恒温 (23℃) 下进行, 每个细胞插均取不同方向的 3 个点, 重复测定 3 次。TEER = (接种有细胞的样品读数 - 空白对照样品读数) × 0.33。

1.3.2 HRP 通透性实验 细胞培养 10 d 后利用 HRP 作为示踪剂检测单层细胞的通透性。以细胞插内培养 3 d 的细胞为实验对照 (此时镜下可观察到细胞已在细胞插内完全汇合)。未接种细胞仅在细胞插内加入等量相同培养基者的样品为空白对照。将 HRP 溶解于实验用培养基 (无酚红高糖 DMEM 培养基) 中。弃去细胞插原有的培养基, 然后在供池中加入含有 50 μg/mL HRP 的实验用培养基, 受池中加入实验用培养基, 使细胞插内外液面相平。分别于 5、15、30、60、120 min 后, 在受池取出 50 μL 培养基, 加入 100 μL 底物 3, 5, 3', 5'-四甲基联苯胺 (TMB), 室温反应 30 min 后, 用 1 M 的 H₂SO₄ 终止反应, 用酶联免疫检测仪测定 (450 nm), 按下述公式计算通透率: $P_{\text{HRP}} \% = (C_{\text{HRP受池}} \times V_{\text{HRP受池}}) / (C_{\text{HRP供池}} \times V_{\text{HRP供池}}) \times 100 \%。$

1.4 Western blot

提取培养 10 d 的 Bend. 3 细胞总蛋白, 定量后 -70℃ 保存。取 50 μg 总蛋白样品, 12% 聚丙烯酰胺双向凝胶电泳, 100 V 恒压湿转 100 min 使蛋白转移至 PVDF 膜上, 4℃ 封闭过夜。紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 和内参 Tublin 的一抗稀释倍数分别为 1:800、1:350 和 1:500, 室温下结合 2 h。TBST 洗膜, 10 min, 4 次。兔和鼠二抗稀释倍数分别为 1:7 000 和 1:4 000, 室温下结合 1 h。TBST 洗膜, 10 min, 4 次。加入等量发光剂和增强剂, 反应 2 min。X 光胶片感光后显影、定影。

1.5 直接荧光染色

以 5 × 10⁴/mL 的密度将 Bend. 3 细胞接种于 24 孔板内, 每孔接种 0.5 mL。镜下观察细胞基本于 3 d 左右汇合, 再继续培养 7 d, 行 F-actin 染色: 予 PBS 漂洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 漂洗 3 次, 0.1% tritonX-100 作用 10 min, PBS 漂洗 3 次, 加入罗丹明-鬼笔环肽 2 U/孔, 室温、避光的条件下反应 45 min, PBS 漂洗 5 次, 每次 2 min。荧光显微镜观察拍照, 激发光为绿光。

1.6 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多样本均数

比较采用方差分析,两样本均数比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。全部资料用 Sigma-plot 10.0、Excel 7.0 和 SPSS 14.0 统计软件处理。

2 结果

2.1 形态学结果

倒置显微镜下观察培养 10 d 的脑微血管内皮 Bend.3 细胞。见细胞长梭形,单层紧密排列,没有向多层生长的趋势,互不重叠,汇合成片呈典型的铺路卵石样结构(图 1)。

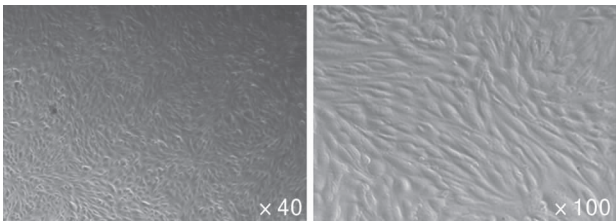


图1 光镜下观察培养培养 10 d 的 Bend.3 细胞 细胞长梭形,汇合成典型铺路石样结构。

2.2 Bend.3 细胞的屏障功能

2.2.1 TEER 结果 Bend.3 细胞的 TEER 随培养时间的延长逐渐升高,在培养 10 d 后,稳定于一个较高的水平。细胞培养 3 d 时,镜下见细胞基本

汇合,TEER 读数为 $37.3 \pm 3.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$,培养到第 10 天,细胞 TEER 读数增加至 $82.3 \pm 6.0 \Omega \cdot \text{cm}^2$,与培养 3 d 相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。培养 10 d 后,细胞 TEER 维持在与 10 d 相近的读数,差异没有统计学意义($P>0.05$)。见图 2。

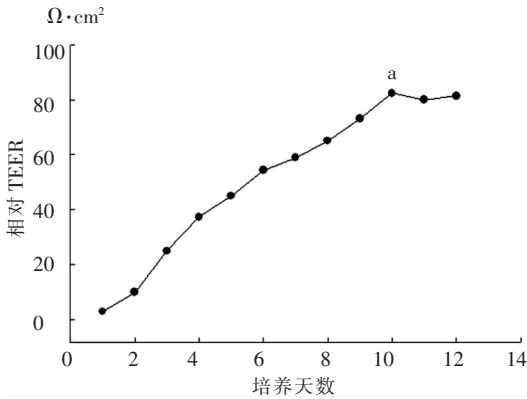


图2 Bend.3 细胞培养时间与相对 TEER 值变化关系 a:与培养 3 d 相比, $P<0.05$ 。

2.2.2 HRP 通透性结果 表 1 结果显示培养 10 d 的 Bend.3 细胞表现出良好的限制物质通透的能力,其平均 HRP 通透率在 5 min、15 min、30 min、60 min、120 min 与培养 3 d 的细胞样品和空白对照比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 各组 Bend.3 细胞 HRP 平均通透率 ($\bar{x} \pm s$, %)

	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min
空白对照	2.45 ± 0.05	2.63 ± 0.06	3.20 ± 0.05	4.60 ± 0.37	9.70 ± 0.16
培养 3 d 样品	2.34 ± 0.02 ^b	2.42 ± 0.05 ^b	2.52 ± 0.05 ^b	2.57 ± 0.06 ^b	4.30 ± 0.20 ^b
培养 10 d 样品	1.88 ± 0.02 ^{a,b}	1.92 ± 0.03 ^{a,b}	1.99 ± 0.03 ^{a,b}	2.03 ± 0.02 ^{a,b}	2.20 ± 0.05 ^{a,b}

a:与培养 3 d 样品比较, $P<0.05$; b:与空白对照比较, $P<0.05$

2.3 Bend.3 细胞表达紧密连接相关蛋白

Bend.3 细胞培养到第 10 天,可见其高浓度表达 Occludin、ZO-1(图 3)。

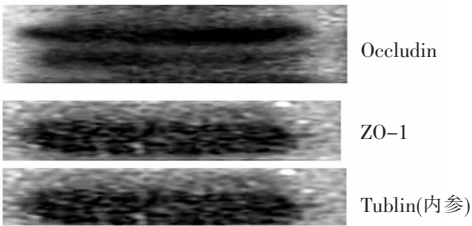


图3 培养 10 d 的 Bend.3 细胞 Occludin、ZO-1 蛋白的 Western blot 结果 Bend.3 细胞高浓度表达紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1。

2.4 F-actin 染色

Bend.3 细胞培养 10 d 左右时,直接荧光染色

可见于 F-actin 主要分布在细胞周边,形成肌动蛋白丝带,线条完整连续,未见明显缝隙形成。见图 4。

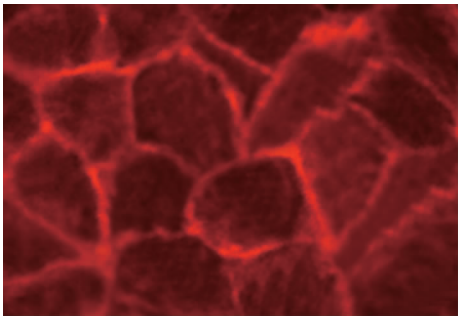


图4 Bend.3 细胞 F-actin 染色(×200) Bend.3 细胞的 F-actin 主要分布在细胞周边,荧光显微镜下见线条连续,无明显缝隙。

3 讨论

BBB是由无窗孔的BMEC及细胞间紧密连接、基膜、周细胞、星形胶质细胞足突和极狭小的细胞外隙共同组成的一个细胞复合体。其中BMEC数量最多,是构成BBB的最主要成分,同时BMEC之间的紧密连接(tight junction, TJ)又是保证BMEC屏障功能的重要结构^[8]。因此寻找一个适当的体外模型用于研究BMEC及其间的紧密连接的屏障功能及调控机制对深入了解BBB各种病理生理过程来说尤为重要。

目前国内外研究BBB多以各种种属原代培养的BMEC为基础,但是原代细胞一系列明显的缺点,如操作复杂、生长缓慢,体外培养传代数代即失去内皮特征,难以排除杂细胞污染等,制约了其在基础研究中的广泛使用。为了进一步深入研究BBB的各类分子调控信号,有人利用多种永生化的细胞株来代替原代培养的BMEC进行研究^[9-10]。但目前研究表明,这些细胞株由于其自身的各种缺陷不能很好地代表BMEC。比如ECV304细胞,虽然培养操作简便、细胞纯度高,具有较好的细胞旁屏障作用,但其并非内皮细胞来源,不适用于以BMEC为研究主体的实验。又如目前在国外被广泛应用于BBB药物转运实验的RBE4细胞株,来源为小鼠的内皮细胞,能表达一系列的内皮标记物和转运蛋白,但目前发现其TEER仅在 $30\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ 左右,提示其细胞旁屏障功能与原代细胞相比较有较大的差异,不能用作BBB细胞旁通透途径和紧密连接的研究。

2007年, Brown等^[7]提出永生化小鼠脑微血管内皮细胞株Bend.3具有较好的细胞旁屏障功能,这给我们提供了一个新的用于替代原代培养BMEC的选择,但目前对于该细胞株的屏障特性的研究较少。本研究将Bend.3细胞培养于细胞培养插的微孔滤膜上,并在形态学、TEER变化、HRP通透性实验、紧密连接蛋白的表达和细胞骨架蛋白的结构分布等方面对该细胞进行了研究。结果证实Bend.3细胞具有类似BMEC的屏障特性,并且表达紧密连接蛋白,可能是目前一种较好的原代BMEC替代细胞。

BBB的屏障作用包括细胞旁屏障作用和跨细胞屏障作用。前者限制了BBB对小分子以及无机离子物质的通透,而后者主要作用是阻止大分子细胞通过BBB,从而保持了大脑内微环境的稳定^[11]。因而细胞旁屏障作用和跨细胞屏障作用是

评价BBB功能必不可少的指标。细胞旁屏障作用可藉由测量内皮细胞单层融合状态下的跨内皮电阻(TEER)来完成, TEER越高说明细胞的屏障作用越强。该法较其他方法更为简便、敏感,而且可以实时跟踪测量,有助于发现细胞旁屏障能力的动态变化。本研究对接种于细胞插内的Bend.3细胞样品进行了连续12 d的TEER测量,发现其TEER随培养时间的延长逐渐升高,并于第10天达到 $82.3\pm 6.0\ \Omega\cdot\text{cm}^2$,其后可稳定于 $75\sim 90\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ 的范围。上述数值与Brown等^[7]的实验结果(TEER在 $80\sim 140\ \Omega\cdot\text{cm}^2$)基本一致,并与大多数目前发表的各个种属原代培养获得的BMEC的TEER值($50\sim 180\ \Omega\cdot\text{cm}^2$)相当^[12-13],这说明培养10 d后Bend.3细胞具有良好的限制物质通透的细胞旁屏障功能。同时本研究发现,在培养第3天镜下即可见到细胞在细胞插内已经完全汇合,然而此时TEER读数为 $37.3\pm 3.1\ \Omega\cdot\text{cm}^2$,仅为培养10 d时的45%,差异有统计学意义。此提示Bend.3细胞刚汇合时屏障功能并不完善,至少在汇合后1周该细胞才具有较好的细胞旁屏障作用。对大分子物质的通透性(即跨细胞屏障作用)也是评价BBB的重要功能指标,但目前对Bend.3跨细胞屏障作用的研究报道罕见。本研究采用了辣根过氧化物酶HRP(相对分子质量40 kD)来研究该细胞的对大分子物质的屏障功能(跨细胞屏障),同一时间HRP通透率越低说明细胞的屏障功能越好。该法灵敏度高、方法简单、实验操作无污染,且吸光度与HRP浓度具有良好的线性关系,加入底物后可直接用酶标仪测定,避免了核素和荧光素以及其它放射性物质标记。本实验结果显示培养10 d的Bend.3细胞表现出良好的限制物质通透的能力,其平均HRP通透率为培养3 d的细胞样品的51.2%,差异有统计学意义。此结果与TEER结果具有一致性,证明该细胞汇合并继续培养7 d其限制大分子物体通透性能力方面较刚汇合时得到了明显的提高,提示接种10 d后Bend.3细胞可获得较好的大分子屏障功能。李曼霞^[14]利用原代培养的大鼠BMEC为基础建立的体外BBB模型的HRP通透率为3.56%,而本研究培养10 d Bend.3细胞的HRP通透率仅为2.2%,显示培养10 d Bend.3细胞大分子屏障功能与原代BMEC类似甚至更优。

BMEC的屏障功能的主要结构基础是BMEC之间的紧密连接。紧密连接是一种细胞—细胞膜在空间上的连接,主要由跨膜蛋白、胞质附着蛋白和细胞骨架蛋白组成。本研究已证实培养10 d的Bend.3

细胞具有较好的类似原代 BMEC 的屏障功能,那么此时该细胞是否有与 BMEC 类似的紧密连接蛋白的表达和分布?本研究证实了 Bend.3 细胞有高浓度的紧跨膜蛋白 Occludin 和胞质附着蛋白 ZO-1 表达,与 Brown 等^[7]结果一致,并且与原代培养的 BEMC 中的表现相符^[15]。本研究并应用直接荧光染色法观察了细胞骨架蛋白 actin,发现在培养 10 d, Bend.3 细胞的 F-actin 主要分布在细胞周边,形成肌动蛋白丝带,线条完整连续,未见明显缝隙形成。此与既往在原代培养的大鼠 BMEC 中的发现相符^[15]。

综上所述,本实验证实小鼠微血管内皮细胞株 Bend.3 表达紧密连接相关蛋白,具有 BMEC 的屏障特性,且屏障功能在培养 10 d 达到最理想的效果。

[参 考 文 献]

[1] Rubin L, Staddonthe MJ. Cell biology of the blood-brain barrier [J]. Annu Rev Neurosci, 1999, 22(1):11-28.

[2] Wollburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation[J]. Vascular Pharmacol, 2002, 38(6):323-337.

[3] Legros H, Launay S, Roussel BD, Marcou-Labarre A, Calbo S, Laudenbach V, et al. Newborn- and adult- derived brain microvascular endothelial cells show age-related differences in phenotype and glutamate-evoked protease release[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(6):1146-1158.

[4] 彭镜,尹飞,甘娜,张红媛.内毒素脂多糖对体外血脑屏障模型通透性的影响及其机制研究[J].中华医学杂志,2006,86(27):1924-1926.

[5] 吴丽文,尹飞,彭镜,王卫东,甘娜.紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 和 Actin 参与缺氧缺血诱导的血脑屏障通透性增加[J].中

国当代儿科杂志,2008,10(4):514-516.

[6] Roux F, Couraud PO. Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport function [J]. Cell Mol Neurobiol, 2005, 25(1):41-58.

[7] Brown RC, Morris AP, O'Neil RG. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells [J]. Brain Res, 2007, 1130(1):17-30.

[8] Yamamoto M, Ramirez SH, Sato S, Kiyota T, Cerny RL, Ikezu T. Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells[J]. Am J Pathol, 2008, 172(2):521-533.

[9] Cucullo L, Couraud PO, Weksler B, Romero IA, Hossain M, Janigro D. Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(2):312-328.

[10] Schiera G, Sala S, Gallo A, Raffa MP, Pitarresi GL, Di Liegro I, et al. Permeability properties of a three-cell type in vitro model of blood-brain barrier[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(2):373-379.

[11] Lossinsky AS, Shivers RR. Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions [J]. Histol Histopathol, 2004, 19(2):535-564.

[12] Olga CC, Nora TC, Gail F, Ronan PM, Yvonne AB, Paul AC, et al. Influence of basolateral condition on the regulation of brain microvascular endothelial tight junction properties and barrier function[J]. Brain Res, 2008, 1193:84-92.

[13] Dohgu S, Banks WA. Lipopolysaccharide-enhanced transcellular transport of HIV-1 across the blood-brain barrier is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase pathway [J]. Exp Neurol, 2008, 210(2):740-749.

[14] 李曼霞.NE 在离体血脑屏障缺血性损伤中的作用研究[D].重庆:重庆医科大学,2007.

[15] 彭镜,尹飞,甘娜,张红媛.体外血脑屏障模型的建立[J].中国当代儿科杂志,2005,7(6):526-529.

(本文编辑:王庆红)