

·论著·

缺氧对鼠脑微血管内皮细胞 分泌组织型纤溶酶原激活物的影响

徐剑文,张更,王玮,康仲涵

(福建医科大学解剖学教研室,福建 * 福州 350004)

[摘要] 目的 探讨缺氧对体外培养鼠脑微血管内皮细胞分泌组织型纤溶酶原激活物(tissue-type plasminogen activator, TPA)的影响。方法 分别对新生小鼠脑微血管内皮细胞进行原代和传代缺氧条件下培养,常规培养作为空白对照,每组各取8例,吸取培养液用酶联免疫吸附试验测试 TPA 活性。结果 原代培养内皮细胞空白对照组、缺氧组分泌 TPA 活性分别为 $(19.4 \pm 1.7) \times 10^{-2}$ IU/ml, $(22.5 \pm 1.5) \times 10^{-2}$ IU/ml,两者有显著性差异($P < 0.01$);传代培养内皮细胞缺氧组与空白对照组分泌 TPA 活性差异无显著性意义($P > 0.05$)。结论 体外培养鼠脑微血管内皮细胞能合成分泌 TPA;缺氧状态下原代培养内皮细胞产生的 TPA 活性增高。内皮细胞分泌的 TPA 可能是脑缺氧缺血致不可逆神经元损伤的一个重要媒介。

[关键词] 缺氧;微血管内皮细胞;体外培养;组织型纤溶酶原激活物;小鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)03-0247-03

Effect of Hypoxia on the Activity of the Tissue-Type Plasminogen Activator of Brain Microvascular Endothelial Cells in Mice

XU Jian-Wen, ZHANG Geng, WANG Wei, et al.

Department of Anatomy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of hypoxia on the activity of the tissue-type plasminogen activator (TPA) of brain microvascular endothelial cells in mice. **Methods** Microvascular endothelial cells obtained from the brains of newborn mice were cultured in primary and passage under room air and hypoxic conditions to observe the variation in TPA activities. TPA activity was assayed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique. **Results** Following hypoxia, TPA activity in endothelial cells increased in primary culture compared with the controls: $(22.5 \pm 1.5) \times 10^{-2}$ IU/ml vs $(19.4 \pm 1.7) \times 10^{-2}$ IU/ml ($P < 0.01$). TPA activity following hypoxia was not altered in passaged cells. **Conclusions** Neuronal damage following hypoxia may be associated with increased endothelial TPA activity.

Key words: Hypoxia; Microvascular endothelial cell; Cell culture; Tissue type plasminogen activator; Mouse

在缺氧损伤中,血脑屏障中的内皮细胞具有它的两面性,一方面做为血脑屏障的组成部分保护脑,另一方面产生一些物质对脑造成直接毒害^[1]。近年来研究表明,主要由血管内皮细胞合成分泌的组织型纤溶酶原激活物(tissue-type plasminogen activator, TPA)涉及细胞外基质(ECM)的降解活动。本研究通过对新生小鼠脑微血管内皮细胞在缺氧条件下的培养,进一步探讨缺氧后内皮细胞分泌 TPA

活性的变化,为新生儿缺氧缺血性脑损伤机制的研究提供资料。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

参照脑血管内皮细胞培养方法^[2,3],进行原代及传代培养。

[收稿日期] 2000-10-16; [修回日期] 2001-02-15
[基金项目] 福建省教育厅科研基金资助项目(K20045)
[作者简介] 徐剑文(1968-),女,硕士,讲师。

1.1.1 原代培养 新生小白鼠(福建医科大学实验动物中心,普通级昆明小鼠)取脑,体视显微镜下去脑膜,匀浆,经孔径 88 μm (220 目)的尼龙网过滤匀浆悬液, D-Hank's 液洗涤、离心(150 g \times 10 min)收集滤网上的微血管段, 0.1% 型胶原酶(Sigma 公司) 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中消化 30 min, 吸管吹打。离心(150 g \times 10 min), 弃上清后加 D-Hank's 液再离心, 重复 1 次。收集沉淀, 用含 15% 新生牛血清的 DMEM(Sigma 公司) 培养液(Hepes 20 mmol/L, EDGF 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 青霉素 100 u/ml, 链霉素 100 u/ml) 以 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 密度悬浮接种于涂有多聚赖氨酸的培养瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱(美国 FORMA)中孵育, 4 h 后换全液, 以后每 2 天换液 1 次, 并用刮除法去除非内皮细胞, 至细胞铺满瓶底。培养过程中, 取第 9 天细胞标本用 SP 试剂盒(迈新公司)进行因子相关抗原的鉴定: 以 100% 酒精固定贴壁细胞 10 min, PBS 漂洗, 阻断剂处理。一抗为抗因子相关抗原抗体(1:100), 室温下孵育 60 min; 生物素标记的第二抗体, 室温下 10 min; 链亲和素-过氧化物酶溶液, 室温下 10 min; DAB 染色, 苏木素复染, 中性树胶封固。阴性对照组用 PBS 替代一抗。培养 12 d, 离心包埋法制备电镜标本, HU-12A 透射电镜下观察、摄影。

1.1.2 传代培养 待细胞出现“铺路石”征象, 弃培养液, 用 0.125% 胰酶-0.02% EDTA 消化, 离心收集内皮细胞, 以 1:2 比例稀释接种于培养瓶中。以后每 2 天换液 1 次, 至细胞铺满瓶底。

1.2 缺氧实验

原代、传代培养待细胞铺满瓶底, 在倒置相差显微镜下 ($\times 200$)“弓”字型移动标本, 每个培养瓶随机观察并计数 20 个视野的细胞数, 选择细胞数相近的标本进行实验。在培养液表面覆以无菌医用轻质液体石蜡形成缺氧环境^[4](常规培养作为空白对照)。再培养 3 d, 每组各取 8 例, 吸取培养液 100 μl 用酶联免疫吸附试验测试 TPA 活性(TPA 试剂盒购自上海医科大学分子遗传研究室)。

1.3 统计学方法

所得到的数值用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学处理采用成组设计的两样本均数比较的 t 检验。

2 结果

原代培养细胞形态最初呈单一的球形, 培养 5~7 d 后, 细胞呈长梭形, 细胞中央有突出的核, 至第 12 天, 细胞铺展开来, 形成致密的单层细胞, 呈

“铺路石”征象, 生长成片的培养内皮细胞没有向多层生长的倾向, 也没有边缘的重叠, 用因子相关抗原免疫组化检查, 见细胞浆被染成土黄色(图 1)。透射电镜下观察(图 2), 可见细胞胞质内质网、高尔基复合体发达, 游离核糖体、线粒体及吞饮小泡丰富, 胞质中存在大量走向一致的微丝, 尤以周围部明显。双层核膜清晰可见, 未见 Weibel-Palade 小体。相邻内皮细胞间有紧密连接。传代培养的内皮细胞, 生长速度加快, 约 9 d 可基本长满瓶底。缺氧 3 d 后原代培养内皮细胞 TPA 活性明显增高, 传代培养内皮细胞 TPA 活性无明显变化(见表 1)。

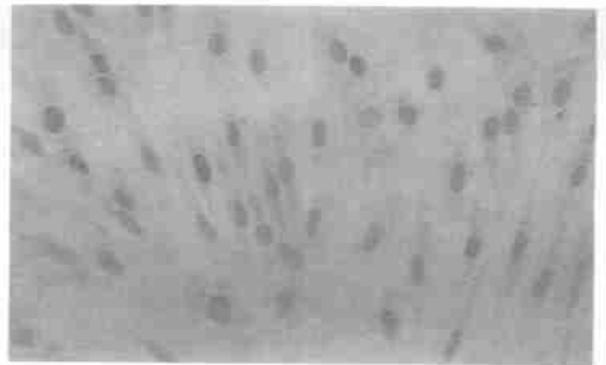


图 1 培养小鼠脑微血管内皮因子相关抗原免疫细胞化学鉴定, 阳性细胞胞浆呈土黄色 ($\times 200$)

Figure 1 The culture of mouse brain microvascular endothelial cells was positive for factor related antigen by immunocytochemical staining.



图 2 原代培养的小鼠脑微血管内皮细胞细胞核(N)明显, 胞质内可见高尔基复合体(G), 粗面内质网(RER), 线粒体(M); 细胞周边微丝()丰富, 细胞间以紧密连接的方式相连() ($\times 25000$)

Figure 2 Mouse brain microvascular endothelial cells of primary culture had a clear nucleus. The cytoplasm contained Golgi complexes, mitochondria, rough endoplasmic reticula, and bundles of filaments located under the cytoplasmic membrane. Cells were bound to each other with tight junction.

表1 缺氧3 d后内皮细胞 TPA 活性的变化

Table 1 TPA activity of brain microvascular endothelial cells following hypoxia ($\bar{x} \pm s$, n=8)

	原代($\times 10^{-2}$ IU/ml)	传代($\times 10^{-2}$ IU/ml)
空白对照组	19.4 \pm 1.7	16.5 \pm 0.6
缺氧3 d组	22.5 \pm 1.5	16.8 \pm 0.7
<i>t</i>	3.853	1.137
<i>P</i>	<0.01	>0.05

3 讨论

TPA 是纤维蛋白溶解系统的重要组成成分,主要由血管内皮细胞合成分泌。脑微血管是脉管系统一个特化区域,因而在脑微环境,微血管内皮可能对依赖纤溶酶的蛋白水解起一定作用^[5]。正常状态下,脑微血管内皮细胞合成分泌一定量的 TPA 参与调节 ECM 更新,这时 TPA 的蛋白水解作用涉及神经细胞、神经胶质细胞的迁移及轴突的生长,特别在胎儿及新生儿时期,此作用更为显著。

ECM 有两个不同的降解系统——内皮源性金属蛋白酶和纤溶酶系统,王玮及 Hamann 等^[6,7]证明缺氧缺血后微血管基膜型胶原和 Laminin 减少,推测系这两个系统蛋白酶活性增高,使 ECM 的型胶原, Laminin, Fibronectin 降解,微血管基膜被破坏。Rosenberg^[8]报道在细菌的胶原酶引导的大脑内出血后 16~24 h,基质金属蛋白酶(MMPs)和 PA 增加,推测蛋白酶增高是大脑内出血常于 1~2 d 出现临床恶化的主要因素。应激状态下 PA 分泌增加,PA 活化纤溶酶原为纤溶酶,纤溶酶是 MMPs 前体的活化剂,故纤溶酶进一步活化 MMPs 前体, MMPs 作用于基膜,引起 ECM 成分水解,破坏血脑屏障的完整性,出现脑水肿,导致大脑内出血的恶化,提示高活性的 TPA 是导致脑损伤的一个潜在因素。本研究原代缺氧条件下培养 3 d,内皮细胞分泌 TPA 活性增高,提示缺氧可致内皮细胞分泌 TPA 活性升高。由此推测,在缺氧缺血应激状态下 TPA 分泌增加,高活性的 TPA 继而引发微血管基膜强烈蛋白水解作用,其速度大于脑微血管内皮细胞合成

分泌型胶原, Laminin, Fibronectin 的速度,使型胶原, Laminin, Fibronectin 合成与降解的动态平衡被打破,基膜破坏,血脑屏障被破坏,引发脑水肿,甚至出血。这可能是新生儿缺氧缺血性脑病病理生理过程中重要环节之一。

星形胶质细胞对内皮细胞有极大的影响。研究证实,将非神经组织的血管移植于脑组织中生长,可以获得脑内皮细胞的某些特性。脑内皮细胞与星形胶质细胞共同培养,可以刺激脑内皮细胞特征酶 - GT 的表达^[9]。本实验中,传代培养的内皮细胞在缺氧条件下其分泌 TPA 活性无明显改变,可能由于传代培养的内皮细胞在体外环境发生改变,合成分泌蛋白酶受到影响。推测系缺乏星形胶质细胞的介导作用所致,或者是由于传代后内皮细胞机能下降。要维持脑微血管内皮细胞的全部特征,是否需要星形胶质细胞的参与,有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Betz AL. Alterations in cerebral endothelial cell function in ischemia [J]. *Adv Neurol*, 1996, 71: 301 - 311.
- [2] 钱志远,黄强,周丽英,等. 鼠脑微血管内皮细胞的分离与长期培养 [J]. *细胞生物学杂志*, 1999, 21(1): 42 - 45.
- [3] 王建民,施永德,步燕芳,等. 大鼠脑血管内皮细胞的分离培养与形态学观察 [J]. *解剖学杂志*, 1998, 21(6): 495 - 499.
- [4] 杨勤,邱云芳,沈馨亚,等. 缺氧对体外培养的雪旺细胞形态和迁移的影响及 Egb 761 抗缺氧研究 [J]. *神经解剖学杂志*, 1999, 15(3): 273 - 276.
- [5] Zokovic BV. Expression of tissue plasminogen activator in cerebral capillaries: possible fibrinolytic function of the blood-brain barrier [J]. *Neurosurgery*, 1995, 37(5): 955 - 961.
- [6] 王玮,陈春鹏,康仲涵. 缺血缺氧时新生大鼠脑微血管基膜细胞外基质与脑细胞线粒体钙的变化 [J]. *神经解剖学杂志*, 1999, 15(3): 213 - 216.
- [7] Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, et al. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion [J]. *Stroke*, 1995, 26(11): 2120 - 2126.
- [8] Rosenberg GA, Navratil M. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat [J]. *Neurology*, 1997, 48(4): 921 - 926.
- [9] 崔高宇. 血脑屏障结构研究近况 [J]. *国外医学脑血管疾病分册*, 1997, 5(5): 277 - 280.

(本文编辑:曹励之)