

· 临床研究 ·

体外血脑屏障模型的建立

彭镜, 尹飞, 甘娜, 张红媛

(中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008)

【摘要】目的 建立一种相对简单可靠、接近在体状态的 SD 大鼠体外血脑屏障模型。**方法** 原代分离、纯化培养大鼠脑微血管内皮细胞和星型胶质细胞, 将两种细胞共培养建立体外血脑屏障模型。VIII 因子、GFAP 免疫组化鉴定细胞类型, 相差显微镜下观察细胞形态, 透射电镜观察内皮细胞超微结构及紧密连接, γ 计数器测定核素标记牛血清白蛋白(^{125}I -BSA)通透量检测血脑屏障(BBB)功能。**结果** VIII 因子、GFAP 免疫组织化学结果显示培养的脑微血管内皮细胞和星型胶质细胞纯度分别为 90% 和 99% 以上。透射电镜显示内皮细胞间有高度发达的紧密连接、未见有 Weible-Palade 小体、少见吞饮小泡。 ^{125}I -BSA 通透量结果显示, 血脑屏障模型组在限制大分子量物质的能力上优于其他各组, 与脑微血管内皮细胞单独培养组及空白对照组比较, 差异有显著性意义($P < 0.01$)。**结论** 利用同种属脑微血管内皮细胞与星型胶质细胞共培养, 建立了一种简便可行、与在体血脑屏障结构类似, 并具有在体血脑屏障的限制物质通透能力的 SD 大鼠体外血脑屏障模型。 [中国当代儿科杂志, 2005, 7(6):526-529]

【关键词】 血脑屏障; 模型; 体外; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2005)06-0526-04

Establishment of an in vitro model of the blood brain barrier

Jing PENG, Fei YIN, Na GAN, Hong-Yuan ZHANG. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Email: yf3079@hotmail.com)

Abstract: Objective To establish a relatively simple, reliable and reproducible in vitro model of the blood brain barrier (BBB). **Methods** Cortical brain microvascular endothelial cells (BMEC) and astrocytes (AS) from 7-day-old rats were co-cultured in cell culture inserts. VIII-factor and GFAP immunocytochemistry were used to identify the cell types of the BBB model. Cell morphological changes were observed under light and transmission electron microscopes. At the same time, the BBB restrictive characteristics were assessed by ^{125}I -BSA permeability. **Results** The positive rates of BMEC and AS were 95 % and 99% respectively. The densely packed cells were observed and the characteristic BMEC 'cobblestones' were exhibited under the microscope on the 10th day of culture. Meanwhile a relative lack of pinocytic vesicles and the tight junction between the BMEC were presented. BMEC displayed a significant restriction of paracellular transport. **Conclusions** An in vitro BBB model by co-culture with allogenic BMEC with AS was established, which was simple, reliable and reproducible as well as similar to the in vivo BBB in respect to morphology, ultrastructures and restriction characteristics. [Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(6):526-529]

Key words: Blood brain barrier; Model; In vitro; Rats

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)是存在于脑组织与血液之间的一个复杂的细胞系统, 它能控制血液循环中某些物质向中枢神经组织转运, 从而保证中枢神经组织内环境的稳定^[1]。要想深入了解 BBB, 从细胞和分子水平认识其结构、生理和生化机制, 探讨病理状态如缺血、炎症、中毒等对 BBB 的影响, 仅仅依靠在体内的研究是远远不够的。而建立一种相对简单可靠、接近在体状态的体外 BBB 细胞模型是各国学者多年来的愿望。为此, 我们参考国内外文献, 利用同种属的脑微血管内皮细胞

(brain microvascular endothelial cell, BMEC) 和星型胶质细胞(astrocytes, AS) 共培养, 成功建立了一种实验设备要求简单、实验成本较低、重复性好、接近在体状态的 SD 大鼠体外血脑屏障模型。

1 材料与方法

1.1 材料

健康 Sprague-Dawley 新生 7 日龄大鼠, 由中南大学湘雅医学院动物部提供。DMEM 液体培养基,

[收稿日期] 2005-08-10; [修回日期] 2005-11-10

[作者简介] 彭镜, 女(1977-), 硕士, 主治医师。主攻方向: 小儿神经系统疾病。

[通讯作者] 尹飞, 中南大学湘雅医院儿科, 邮编: 410008

胎牛血清 (Hyclone), bFGF、EGF (Pepro Tech EC), 兔抗人 VIII 因子相关抗原 (Santa Cruz 公司), 小鼠抗大鼠神经胶质纤维酸性蛋白单抗 (GFAP Neomarkers), 细胞共培养用 0.4 μm 6 孔板 Cell Culture Insert (millipore), 其余生化试剂均为进口分装或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 大鼠脑微血管内皮细胞体外培养 参照 Ichikawa^[2] 的方法, 取新生 7 d 左右的 SD 大鼠 20 只, 无菌条件下取脑, 立即放入盛有 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 D-Hank's 液的平皿中, 仔细剔除脑膜、大血管及髓质, 将收集到的大脑皮质用利剪剪成 1 mm^3 大小, 用玻璃匀浆器匀浆。匀浆液先后通过孔径为 170 μm 及 75 μm 的不锈钢滤网, 收集网上微血管段, 1000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀的微血管段。将微血管移入含 0.1 % 胶原酶及 0.005 % D Nase 酶的 DMEM/F12 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡消化 20 ~ 30 min。再次以 1000 r/min 离心 15 min, 取沉淀, 加完全培养基 (DMEM/F12 添加 20% 胎牛血清、EGF 及 bFGF 各 20 $\mu\text{g/L}$) 制成细胞悬液, 接种于 50 mL 涂鼠尾胶培养瓶中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 2 h 后吸出细胞悬液, 转接种于一次性培养瓶中继续培养, 以后每 2 ~ 3 d 换液 1 次, 7 ~ 10 d 长满成单层时, 以 1×10^6 密度传代。予 VIII 因子免疫细胞化学染色鉴定。

1.2.2 大鼠星型胶质细胞体外培养 按已建立的方法分离和纯化星型胶质细胞^[3], 予 GFAP 免疫细胞化学染色鉴定。

1.2.3 体外血脑屏障模型的建立 参照 Hurst^[4] 的方法, 先将 1×10^6 个纯化的 AS 接种于细胞培养插的背面, 待胶质细胞 80 % 融合后, 再将第 2 ~ 4 代的、 1×10^6 个脑微血管内皮细胞接种于微孔膜的正面, 使其通过微孔形成共培养。6 孔板内加入 10% FCS 高糖 DMEM 2.0 mL, 细胞培养插内加入同样的培养基 1.5 mL, 保证培养板插内外两侧液面相等, 2 ~ 3 d 换液 1 次。接种后第 10 天开始实验。

1.3 模型鉴定

1.3.1 光镜和透射电镜观察细胞形态 光镜: 倒置显微镜下每日观察原代分离的 BMEC 形态变化。透射电镜: 取培养第 10 天已融合成单层的细胞制作

透射电镜标本, 原位包埋法制作电镜标本, 观察照相。

1.3.2 γ 计数仪检测¹²⁵I-牛血清白蛋白 (¹²⁵I-BSA) 通过量评价 BBB 通透性 实验分为脑微血管内皮细胞单独培养组、BBB 模型组、无任何细胞的空白对照组, 其样本数均为 4。取待用模型, 吸出培养液反复冲洗内外池, 重新向内外池内加入不含血清的 DMEM 培养液, 并向细胞培养插内加入¹²⁵I-BSA 100 μL , 置 CO_2 培养箱中培养, 分别于 30, 60, 120, 180, 240 min 时从外池中取液 10 μL , γ 计数仪及时检测其每分钟放射强度计数, 计算出其贝克 (Bak) 值, 绘制 Bake-时间曲线。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 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。 $p < 0.05$ 被认为有统计学差异。全部资料用 Excel 7.0 和 SPSS11.0 统计软件处理。

2 结果

2.1 VIII因子及 GFAP 免疫组化鉴定 BMEC 及 AS

VIII 因子及 GFAP 免疫组化阳性率分别为 95% 和 99%, 表明分离纯化脑微血管内皮细胞和星型胶质细胞成功。

2.2 光镜、电镜观察细胞形态变化

光镜: 倒置显微镜下观察 7 ~ 9d 融合成片的脑微血管内皮细胞, 见细胞紧密排列, 没有向多层生长的趋势, 互不重叠, 呈典型的铺路卵石样结构 (图 1)。

透射电镜: 观察培养第 10 天的细胞, 脑微血管内皮细胞间可见连续、高密度的紧密连接; 未见有 Weible-Palade 小体; 较少吞饮小泡 (图 2)。

2.3 BBB 通透性实验结果

从表 1 可以发现通透性从小到大依次为 BBB 模型组、脑微血管内皮细胞单独培养组及空白组。同一时间点之间进行分组比较, 空白组的限制通透性的能力明显低于其余 2 组, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。脑微血管内皮细胞单独培养组在早期 (30 min) 仍表现出较好的屏障功能, 其 Bake 均数与

表 1 3 组样本¹²⁵I-BSA 通透性指标 Bake 均数变化表

($\bar{x} \pm s$, cpm/30 s)

分组	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min
空白组	452 $\pm$ 39.43 ^b	886.75 $\pm$ 16.15 ^b	977.75 $\pm$ 50.59 ^b	1 171.75 $\pm$ 45.65 ^b	1 274.5 $\pm$ 106.96 ^b
BMEC 单独培养组	103.75 $\pm$ 6.95 ^c	121.5 $\pm$ 2.65 ^{a,c}	210.5 $\pm$ 13.08 ^{b,c}	286.75 $\pm$ 9.32 ^{b,c}	335.5 $\pm$ 10.63 ^{b,c}
BBB 模型组	84.5 $\pm$ 3.51 ^c	98.75 $\pm$ 2.22 ^c	123.5 $\pm$ 3.42 ^c	147.25 $\pm$ 1.89 ^c	157 $\pm$ 5.48 ^c

各时间点分别进行各组间比较。与 BBB 模型组比较: a $P < 0.05$; b $P < 0.01$; 与空白组比较: c $P < 0.01$

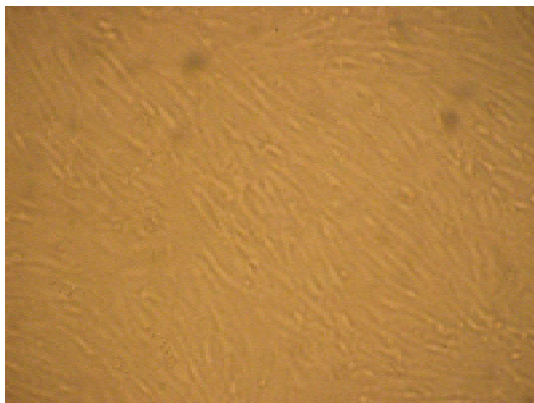


图1 培养第10天已融合成片的BMEC倒置相差显微镜下观察,可见细胞紧密排列,没有向多层生长的趋势,互不重叠,呈典型的铺路卵石样结构。(×100倍)



图2 培养第10天已融合成片的BMEC原位包埋法透射电镜观察,可见内皮细胞间有光滑、连续、高密度的紧密连接;较少吞饮小泡;未见有Weibel-Palade小体。(×10 000倍)

BBB模型组比较,差异无显著性意义($P>0.05$),在60 min后其屏障功能逐渐减弱,差异有显著性意义($P<0.01$)。而BBB模型组一直表现出较好的限制物质通透能力,其 ^{125}I -BSA通过量在60,120,180,240 min与其余两组比较,差异均有显著性意义($P<0.01$)。

3 讨论

近年来随着对BBB功能和重要性的逐步认识,建立一种相对简单、接近在体状态的体外BBB模型,用来进行BBB的相关研究显得尤为紧迫。在高等脊椎动物,BBB主要包括三层结构:脑微血管内皮细胞、基底膜和星型胶质细胞终足。一系列研究显示^[5,6],星型胶质细胞对BBB酶、粘附连接蛋白、紧密连接蛋白的表达,转运功能,限制物质通透性功能具有非常重要的调节作用。故目前,在脑星型胶质细胞培养的基础上,分离和纯化单层血管内皮细胞,共培养建立了一系列体外BBB模型。

在体条件下星型胶质细胞与脑微血管内皮细胞二者隔着基膜不直接接触,其间仅有2~3 nm的间隙。因此,BBB模型建立的关键就是使用带多孔滤膜的细胞培养插作为脑微血管内皮细胞和星型胶质细胞共培养的载体,将两种细胞分别接种于滤膜的两侧,使其在形态和结构上与在体非常接近。滤膜不仅可作为细胞生长的支持物,而且能够较好的维持细胞的生长与介导细胞间信息的传递。在此类模型中内皮细胞的来源比较复杂,包括脑微血管内皮细胞、大动脉内皮细胞、脐静脉内皮细胞。尽管目前并没有统一和公认的标准,采用同种属的脑微血管内皮细胞和星型胶质细胞共培养最接近在体状态,

应为最佳选择。我们在实验中经过反复摸索,建立了一种简便可靠的分离纯化培养脑微血管内皮细胞的方法:①原代培养需要收集到足够的脑血管段,我们的经验是大约需要7 d左右的乳鼠20只;②仔细剔除脑膜有助于纯化脑微血管内皮细胞,避免成纤维细胞污染;③脑组织匀浆后,国外多采用密度梯度离心法,能得到较为纯净的微血管段,但需要高速离心机,且操作过程复杂,分离时间长,减少了细胞的产量。因为鼠脑微血管的直径在80 μm左右,选择按顺序通过150 μm和75 μm两种孔径的滤网,能较好的除去大血管和大组织块,得到较为纯净的微血管段。④采用差速贴壁法在原代培养2 h后,将细胞悬液转接种到另一培养瓶中继续培养,是因为成纤维细胞最早贴壁,此举可减少成纤维细胞的污染,并有效防止死细胞释放物质对活细胞的影响。本实验结果显示,VIII因子免疫组化结果阳性率为95%以上,表明培养的细胞绝大多数属于脑微血管内皮细胞。相差显微镜下肉眼观察原代培养8~10 d的脑微血管内皮细胞排列紧密,没有向多层生长的趋势,互不重叠,呈典型“铺路卵石样”结构。表明分离纯化培养脑微血管内皮细胞成功。

血脑屏障脑微血管内皮细胞具有不同于其他微血管内皮细胞的独特结构和功能,即细胞间存在着广泛的紧密连接、缺少窗口结构、无Weibel-Palade小体。这些特点使其成为BBB的主要结构基础。电镜技术是目前唯一能够直接观察紧密连接的研究手段,因而也是评价BBB模型的重要工具^[7]。本研究采用原位包埋法进行透射电镜观察,此方法避免了常规离心法对细胞连接的破坏,最大限度的保留了细胞的正常连接和分布状态。透射电镜发现通过细胞培养插与星型胶质细胞共培养的脑微血管内皮

细胞间存在高度发达、光滑和连续的紧密连接,较少吞饮小泡,未见 Weible - Palade 小体。显示符合血脑屏障脑微血管内皮细胞的超微结构特点。

尽管形态学指标具有直接、客观等特点,但是形态学上的完整或相似不能等同于具有完整的屏障功能。理想的 BBB 模型应对各种大分子物质具有良好的限制通过作用。因此,功能评价是确定一个模型是否符合要求的不可缺少的关键步骤。^[125] I-BSA, 是大分子量蛋白质,用来评价 BBB 限制大分子物质通透的功能。研究结果显示, BBB 模型组在限制大分子量物质的能力上优于其他各组,与脑微血管内皮细胞单独培养组及空白对照组比较,差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。

实验结果显示,我们建立的体外 BBB 细胞模型在细胞形态、超微结构、限制通透性等功能方面都保留了体内 BBB 的特性。利用同种属脑微血管内皮细胞与星型胶质细胞共培养,建立了一种简便可行、与在体 BBB 结构类似,并具有在体 BBB 限制物质通透的 SD 大鼠体外 BBB 模型。

[参 考 文 献]

- [1] Engelhardt B. Development of the blood-brain barrier[J]. Cell Tissue Res, 2003, 314(1):119-129.
- [2] Ichikawa N, Naora K, Hirano H, Hashimoto M, Masumura S, Iwamoto K. Isolation and primary culture of rat cerebral microvascular endothelial cells for studying drug transport in vitro[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 1996, 36(1):45-52.
- [3] 彭镜,尹飞,毛定安. 川芎嗪对培养大鼠星型胶质细胞在糖氧剥离损伤中的保护作用[J]. 中风与神经疾病杂志, 2004, 21(5):397-399.
- [4] Hurst RD, Fritz IB. Properties of an immortalised vascular endothelial/glioma cell co-culture model of the blood-brain barrier[J]. J Cell Physiol, 1996, 167(1):81-88.
- [5] Fischer S, Wobben M, Kleinstuck J, Renz D, Schaper W. Effect of astroglial cells on hypoxia-induced permeability in PBMEC cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 279(4):C935-944.
- [6] Gaillard PJ, Voorwinden LH, Nielwen JL, Ivanov A, Atsumi R, Engman H, et al. Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes[J]. Eur J Pharm Sci, 2001, 12(3):215-222.
- [7] Vorbrodt AW, Dobrogowska DH. Molecular anatomy of interendothelial junctions in human blood-brain barrier microvessels[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2004, 421(2):67-75.

(本文编辑:吉耕中)

(上接第 525 页)

上皮细胞再生,损伤后的短时间内胃黏膜上皮细胞可快速重建,恢复完整,加快黏膜修复。丹参可通过促进内源性前列腺素(PG)的合成和释放,使 HCO_3^- 与黏液分泌增加,发挥其保护作用^[12]。同时有人证实它也是胃肠道运动的调节剂和自由基清除剂^[13]。下一步为提高临床防治儿童应激性溃疡水平,我们将针对丹参进行一系列有目的的研究。

[参 考 文 献]

- [1] 张一楚. 应激性溃疡[J]. 上海医学, 1999, 22(8):454-456.
- [2] Messori A, Trippoli S, Vaiani M, Gorini M, Corrado A. Bleeding and pneumonia in intensive care patients given ranitidine and sucralfate for prevention of stress ulcer: meta-analysis of randomized controlled trials[J]. BMJ, 2000, 11(4):1103-1106.
- [3] Yildizdas D, Yapicioglu H, Yilmaz HL. Occurrence of ventilator-associated pneumonia in mechanically ventilated pediatric intensive care patients during stress ulcer prophylaxis with sucralfate, ranitidine, and omeprazole[J]. J Crit Care, 2002, 17(4):240-245.
- [4] 郑艳平,王星娜. 佐以丹参为主治疗新生儿硬肿症的体会[J].

中国当代儿科杂志, 1999, 1(4):234-235.

- [5] 陈海平. 复方丹参注射液治疗新生儿硬肿症疗效观察[J]. 中国当代儿科杂志, 1999, 1(3):164.
- [6] 王亚利, 张式暖, 姜萍, 刘景邦, 吕爱敏. 复方丹参注射液对小鼠心肌保护作用的研究[J]. 中国当代儿科杂志, 1999, 1(4):211-213.
- [7] 张向荣, 潘卫三, 胡军. 丹参对消化性溃疡的研究概况[J]. 中草药, 2000, 8(31):附 11-13.
- [8] 杨卫文, 黎莉, 杨景林, 胡志恒. 丹参治疗消化性溃疡的疗效及机制探讨[J]. 中华消化杂志, 2002, 7(22):483-485.
- [9] 牛廷献, 史志勇, 罗晓红. 大鼠应激性溃疡发生机制及防治的研究[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(10):75-76.
- [10] 黄梅芳, 邓长生, 易季云, 林军, 周燕. 丹参对实验性急性乙醇胃黏膜损伤的保护作用及其机理的研究[J]. 中华消化杂志, 1996, 16:82-84.
- [11] 王国中, 夏艳杰, 丁丽华, 茹新, 杨香琴. 丹参抗大鼠乙酸胃溃疡的实验研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 1997, 18(3):166-168.
- [12] 杨永杰, 王化河, 王强. 丹参对大鼠急性胃黏膜损伤保护作用的研究[J]. 江苏中医药, 2004, 25(7):54-55.
- [13] 李林, 陈志伟, 石岩. 丹参素临床应用的研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2004, 2(25):181-182.

(本文编辑:吉耕中)