论著

文章编号:1000-5404(2008)02-0174-02

TNF-α对体外培养豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞通透性的影响

李 琪,张学渊 (第三军医大学西南医院耳鼻咽喉科,重庆 400038)

摘 要:目的 研究TNF-α对体外培养豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞通透性的影响。方法 体外分离培养豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞并建立耳蜗血管纹微血管内皮细胞通透性体外模型,实验分TNF-α组和对照组。依据作用时间和浓度不同,检测其对伊文思蓝的通透率变化。结果 TNF-α能显著增加耳蜗血管纹微血管内皮细胞的通透性,使伊文思蓝的通透率显著升高($P<0.01$),且随TNF-α浓度升高和作用时间的延长而升高。结论 TNF-α可以显著的增加耳蜗血管纹微血管内皮细胞的通透性。

关键词:肿瘤坏死因子-α;血迷路屏障;内皮细胞;通透性
中图法分类号:R322.13;R322.923;R329.27 文献标识码:A

Effect of TNF-α on blood-labyrinth barrier permeability of microvascular endothelial cells from cochlear stria vascularis of guinea pig

LI Qi, ZHANG Xue-yuan (Department of Otolaryngology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of TNF-α on regulating the blood-labyrinth barrier permeability of cochlea of guinea pig. Methods The stria vascularis was acquired from guinea pigs and the endothelial cells were cultured of with purified to establish the models of the blood-labyrinth barrier according to our previous researches. The models were treated with TNF-α (0.05, 0.1, 0.2 ng/ml) for 30, 60, 90 min or with serum-free DMEM as control. Then their permeability was measured by Evens blue technique. Results TNF-α increases Evans blue transfer across endothelial cell monolayer ($P<0.01$). The filtration rate of Evans blue across the endothelial cell monolayer increased positively with prolonged treatment time or the increasing TNF-α concentration. Conclusion TNF-α enhances the permeability of blood-labyrinth barrier in guinea pig.

Key words: TNF-α; blood-labyrinth barrier; endothelial cells; permeability

耳蜗血管纹微血管内皮细胞是构成血迷路屏障的结构基础,其形态和结构的改变可以直接导致血迷路屏障的通透性发生变化,导致内耳损坏[1],对其调控的因素目前知之甚少,我们通过研究TNF-α对耳蜗血管纹微血管内皮细胞通透性的影响,探讨它在内耳病理生理过程中的作用和意义。

1 材料与方法

1.1 材料

兔抗人Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体试剂盒由北京中山生物技术有限公司生产;Millicell(底部为多聚醋酸酯滤膜的培养碟,底面积为4.2 cm,微孔直径为0.4 μm,由Millipore公司生产)使用前滤膜上分别涂以醋酸鼠尾胶原和黏连蛋白(Roche)液;TNF-α原液购于Peprotech EC公司;伊文思蓝粉剂为上海生化工程公司产品;胎牛血清为HyClone公司产品;DMEM高糖型固体培养基为Gibco公司产品。

1.2 方法

1.2.1 微血管内皮细胞通透性体外模型的构建 本课题组于前期研究[2,3]利用组织细胞培养技术在国内外首先培养出豚鼠耳蜗微血管内皮细胞,经纯化后通过检测标志性抗原Ⅷ因子证实其为基本纯净的内皮细胞。

参照本课题组前期的研究结果[1,3],将耳蜗做血管内皮细胞通透性体外模型分为内池和外池两部分组成。内池为Millicell,外池为6孔培养板的培养孔。使用时将Millicell放入培养孔中,^{60}Co照射灭菌后,向内池中按$5\times10^{4}\,cm^{-2}$的细胞数接种豚鼠耳蜗做血管内皮细胞悬液,尔后向内外池中加入血清培养液后置CO_2孵箱中培养7~8 h,观察内皮细胞已完全形成致密融合的单层时,该系统即为内皮细胞通透性体外模型。

1.2.2 TNF-α对耳蜗血管纹微血管内皮细胞通透性体外模型的影响

1.2.2.1 实验分组 按处理因素分4组:TNF-α 0.05 ng/ml

作者简介:李 琪,男,重庆市人,硕士,医师,主要从事内耳血迷路屏障方面的研究。电话:(023)68773143
通信作者:张学渊,电话:(023)68765390,E-mail:yingSC@public.cta.cq.cn
收稿日期:2007-04-18;修回日期:2007-10-20

处理组、TNF-α 0.1 ng/ml 处理组、TNF-α 0.2 ng/ml 处理组及对照组(对照组用无血清 DMEM 代替,其余处理相同),每组 5 个模型。

1.2.2.2　伊文思蓝通透率的检测　　参照本课题组前期的研究[3],各组中每个模型内池分别加入 1 ml 0.05、0.1、0.2 ng/ml TNF-α 及无血清 DMEM,分别在 37 ℃、5% CO_2 恒温孵箱内孵育 30、60、90 min,然后内池再分别加入 50 μl 10 mg/ml 伊文思蓝溶液,外池加入适量无血清 DMEM,使内外池液面平衡,消除静水压,室温下孵育 30 min,分别取各模型内外池溶液 1 ml,在分光光度计(Beckman Du-600)上分析波长 687 nm 测定各溶液的吸光度值[$D(687)$]。伊文思蓝通透率 = 外池溶液 $D(687)$/内池溶液 $D(687)$。

1.3　统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析和 t 检验。

2　结果

经过不同时间、不同浓度的 TNF-α 作用,各组对伊文思蓝的通透率与对照组比较,存在显著差异($P<0.01$),前者明显高于后者,且不同浓度的 TNF-α 各组之间对伊文思蓝的通透率也有显著差异($P<0.01$),伊文思蓝的通透率随着 TNF-α 浓度的增加而升高。可认为经过不同时间、不同浓度的 TNF-α 作用后,对内皮细胞单层的通透性的影响不同,且随着时间增加,细胞单层的通透性呈增加趋势(表 1)。

表 1　不同时间、不同浓度各组伊文思蓝的通透率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	30 min	60 min	90 min
对照组	0.0361 ± 0.0003	0.0361 ± 0.0003	0.0361 ± 0.0003
TNF-α 0.05 ng/ml 处理组	0.0568 ± 0.0002[a]	0.0928 ± 0.0002[ab]	0.1488 ± 0.0002[ae]
TNF-α 0.1 ng/ml 处理组	0.0779 ± 0.0002 [b]	0.1339 ± 0.0002 [abcd]	0.2150 ± 0.0002 [cde]
TNF-α 0.2 ng/ml 处理组	0.0989 ± 0.0002[abc]	0.1747 ± 0.0008 [abcd]	0.2802 ± 0.0008 [adce]

a,b,c:$P<0.01$,与对照组、0.05 ng/ml 组、0.1 ng/ml 组比较;d:$P<0.01$,与 30 min 比较;e:$P<0.01$,与 60 min 比较

3　讨论

血迷路屏障是存在内淋巴与血液之间的功能类似于血脑屏障的一种组织结构,其构成的基础是内耳毛细血管内皮细胞。内皮细胞形态和结构的变化可以导致血迷路屏障通透性的改变,从而影响到内淋巴的电化学平衡。以往对血迷路屏障的研究多在动物活体上进行在体实验,多采用各种离子的示踪观察,发现血迷路屏障通透性的变化与多种内耳疾病有关[4]。其通透性可以受到多种因素的调控,比如噪声[5]可以增加血迷路屏障对大分子物质的通透,但是对其调控因素的了解目前还很局限,故对其调控因素的研究,有助于探索多种内耳疾病的机制。

TNF-α 是一个重要的细胞因子,有着广泛的生物学作用,TNF-α 在许多病理状态下有着广泛的细胞来源,参与免疫炎性反应过程。在很多情况下,TNF-α 作为炎症前因子常参与内耳的病理生理过程,Tangpong 等[6]通过研究发现,TNF-α 可能介导了阿霉素引起的中枢神经系统损害,而 Farkas 等[7]发现,TNF-α 可能损伤血脑屏障,通过刺激产生 NO,使得脑血流速度加快,星形细胞肿胀。Gloddek 等[8]认为,在突发性耳聋和病毒感染密切相关,病毒感染引起的血管周围炎常波及到血管纹,引起局部的灌流不足,从而缺氧,在这个过程中,微血管内皮细胞可以分泌炎性因子如 IL-1、TNF-α 等,促进微血管周围炎的发生,导致耳聋的加重。由此可以看出,在很多内耳病的发病机制中,TNF-α 可能起了很重要的作用。通过本研究结果显示,TNF-α 可以增加耳蜗血管纹微血管内皮细胞通透性体外模型的通透性,并随时间和浓度的增加而加强。

TNF-α 可能导致细胞线粒体功能障碍,产生自由基,细胞发生氧化应激,从而可以导致细胞发生凋亡[6]。TNF-α 还可以促进内耳组织产生一氧化氮合酶(NOS),产生大量 NO,在病毒和细菌感染引起的中耳和内耳疾病中,有神经毒性和收缩血管的作用[9]。在我们的体外细胞培养通透模型实验研究中,TNF-α 可能主要通过诱导产生大量的 NOS,生成 NO 以介导微血管内皮细胞的损伤和形态结构的改变,引起通透模型的通透性增加。

参考文献:

[1] 张学渊, 魏运军. 耳蜗微血管内皮细胞通透性体外模型的研究[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2001, 36(6): 409 – 411.

[2] 魏运军, 张学渊. 豚鼠耳蜗微血管内皮细胞的分离培养与鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(3): 324 – 326.

[3] 潘明金, 张学渊. 豚鼠耳蜗微血管内皮细胞通透性分子调控机制得初步研究[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2006, 20(4): 180 – 183.

[4] 向召兰, 张学渊. 内毒素致豚鼠血迷路屏障通透性及其超微结构观察[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(22): 2235 – 2238.

[5] Suzuki M, Yamasoba T, Ishibashi T, *et al*. Effect of noise exposure on blood-labyrinth barrier in guinea pigs[J]. Hear Res, 2002, 164(1-2): 12 – 18.

[6] Tangpong J, Cole M P, Sultana R, *et al*. Adriamycin-induced, TNF-alpha-mediated central nervous system toxicity[J]. Neurobiol Dis, 2006, 23(1): 127 – 139.

[7] Farkas E, Sule Z, Toth-Szuki V, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha increases cerebral blood flow and ultrastructural capillary damage through the release of nitric oxide in the rat brain[J]. Microvasc Res, 2006, 72(3): 113 – 119.

[8] Gloddek B, Lamm K, Arnold W. Pharmacological influence on inner ear endothelial cells in relation to the pathogenesis of sensorineural hearing loss[J]. Adv Otorhinolaryngol, 2002, 59: 75 – 83.

[9] Hess A, Bloch W, Huverstuhl J, *et al*. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the cochlea of guinea pigs after intratympanical endotoxin-treatment[J]. Brain Res, 1999, 830(1): 113 – 122.

(编辑　郭建秀)