文章编号:1000-5404(2008)22-2093-03

论著

体外血脑屏障模型的建立与鉴定

杨钰楠[1],高云华[1],娄晋宁[2],刘 平[1],付赤学[1] ([1]第三军医大学新桥医院超声科,重庆 400037;[2]中日友好医院临床医学研究所,北京 100029)

摘 要:目的 应用原代分离培养BALB/c小鼠脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMVEC)建立体外血脑屏障模型,探讨跨血脑屏障(blood brain barrier,BBB)电阻与屏障渗透功能的动态关系以及最佳构建条件。**方法** 用酶消化、机械分离结合密度离心的方法得到原代BALB/c小鼠脑血管内皮细胞,通过培养在具有特殊质材和孔径的Transwell小室上建立BBB体外实验模型,采用倒置显微镜、电镜观察细胞形态结构和生长规律,紧密连接ZO-1蛋白免疫组化检测,比较血脑屏障形成前后膜两侧电阻动态变化与^{3}H葡萄糖通透性的关系等方法,探讨血脑屏障模型的建立及生长特性。**结果** BMVEC培养至汇合后具有典型的"铺路石"样外观;扫描电镜显示细胞形成致密单层,透射电镜、ZO-1蛋白免疫组化证实细胞间形成光滑、连续、高密度的紧密连接;^{3}H葡萄糖的通透量与实时电阻呈负相关,内皮细胞电阻随着通透性的增加而降低,通透率最低时跨细胞电阻为(346±10)Ω/cm^2。**结论** 建立的BBB体外模型在形态学、电阻和通透性方面具备了BBB的基本特性。

关键词: 血脑屏障;体外模型;通透率;电阻
中图法分类号: R-33;R322.81;R331.37 **文献标识码:** A

Establishment of an *in vitro* model of brain blood barrier

YANG Yu-nan[1], GAO Yun-hua[1], LOU Jin-ning[2], LIU Ping[1], FU Chi-xue[1] ([1]Department of Ultrasound, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Institute of clinical Medical Science, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract: Objective To study the dynamic changes of transendothelial electrical resistance (TEER) on our *in vitro* model of brain blood barrier (BBB) made from primary culture of BALB/c mouse brain microvascular endothelial cells (BMVEC), and to explore the relation between TEER and BBB permeability, and search for the best culture condition. **Methods** BMVEC were isolated from BALB/c mouse and cultured on a transwell insert with special micro-pore. The cells were identified with immunohistochemical methods and electron microscope. TEER over BMVEC was measured after BBB model establishment for determining the ^{3}H-Glucose permeability of BBB *in vitro*. **Results** BMVEC cultured in the transwell insert exhibited typical "flagstone" appearance and in a tight monolayer structure under electron microscope. Immunohistochemical detection of ZO-1 protein, a marker antigen of tight junction, showed smooth, continuous and tight junctions between confluent BMVEC. TEER over BMVEC monolayer increased to (346±10) Ω/cm^2 when the permeability for ^{3}H-Glucose was decreased to the minimum. **Conclusion** BBB model *in vitro* made from primary culture of BMVEC in transwell has the basic characteristics of BBB in morphology, electrical resistance and permeability.

Key words: blood brain barrier; *in vitro* model; permeability; electric resistance

体外构建能够模拟血脑屏障独有的选择性屏障功能,探索实时、有效、无创的开放调节血脑屏障(blood brain barrier,BBB)的技术方法是神经医学的研究重点[1]。本研究在原代分离培养小鼠脑微血管内皮细胞的基础上,建立BBB体外模型,提供能进行体外研究BBB功能和通透性的工具,探讨其能实现实时开放的着入点。

1 材料与方法

1.1 体外血脑屏障模型的建立

改进文献[1, 2]的方法,脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMVEC)自BALB/c小鼠脑机械分离和酶消化后用密度离心方法纯化。密度离心后收集中间段乳白色细胞层加入内皮细胞培养基[DMEM,20%胎牛血清,100 U/ml青霉素,100 U/ml链霉素,100 mg/L内皮细胞生长因子,20 mg/L肝素],接种于涂有1%明胶的70 ml培养瓶中。24 h

基金项目:国家自然科学基金(30670545)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670545)
作者简介:杨钰楠,女,重庆市人,博士研究生,主要从事超声造影应用基础方面的研究。电话:(023)68755631
通信作者:高云华,E-mail:xqgaoyh@yahoo.com.cn
收稿日期:2008-04-28;修回日期:2008-05-08

后换液,以后每 2 天换液 1 次,待细胞贴壁长满后,进行传代,以接种密度为 20 000/cm^2 于明胶预先包被的 Transwell 细胞小室内(Falcon,8 μm 孔径,9 mm 直径,膜面积 0.45 cm^2),孵箱中培养至汇合状态(3 d)。

1.2 试漏实验初步判断 BBB 的形成

显微镜下观察 BMVEC 达汇合状态后,用试漏实验初步判断血脑屏障是否形成。将细胞培养基加入到插入器供池内,使供池与受池的液面差 >0.5 cm。于传代后第 3 天过夜,若插入器两池间仍能保持明显的液面差,则认为 BMVEC 已经完全汇合,BBB 基本形成。

1.3 BBB 模型的形态学鉴定

BMVEC 在细胞插入器生长至汇合后,用 2.5%(体积分数)的戊二醛固定细胞 60 min,经 PBS 清洗,脱水,包埋等处理后,行透射电镜和扫描电镜检查。

1.4 BBB 体外实验模型的实时通透性实验

参照文献[3]进行。细胞培养至汇合后,选择试漏实验阳性的细胞小室进行通透性实验。BMVEC 未达汇合状态的小室作为实验的对照。将 ^{3}H 葡萄糖用内皮专用培养基稀释成 370 Bq/μl,在供池中加入 ^{3}H 葡萄糖(50 μl),并定容至 460 μl,受池中加入 1 140 μl 实验用培养基,使细胞插入器内外液面相平,放入培养箱中,并在不同的时间点从受池中取出 50 μl 加入闪烁液,暗室适应 2 h 后液相闪烁计数器计数。

1.5 BBB 体外模型的实时电阻测试

使用内皮细胞电阻仪(Millipore, USA)测量跨内皮细胞电阻。BMVEC 在明胶包被的细胞插入器上培养至未汇合或汇合状态。每天测定跨内皮细胞电阻抗(TEER),第 3 天后与 ^{3}H 葡萄糖通透性实验实时进行:将 Transwell 置于培养基中,减去基础电阻(即没有种植细胞的空白组)后除以小室膜面积即为 TEER(Ω/cm^2)。对照组 TEER 达峰值时 2.5% 戊二醛固定,TEM、SEM 观察细胞在膜上生长情况。

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 试漏实验结果

在显微镜下观察 BMVEC 培养至汇合后,将细胞插入器的液面加高。试漏实验为阳性者细胞插入器能够维持 0.5 cm 的液面差,表明 BMVEC 已经汇合,可以将其作为 BBB 体外模型研究药物的通透性,试漏实验为阴性者作为未汇合的 BMVEC 对照。

2.2 BBB 体外实验模型的形态学鉴定

细胞形态学观察传代的 BMVEC,在明胶包被的细胞插入器的微孔滤膜上生长至汇合状态后,光镜下见接种 2 ~ 3 h 即开始贴壁,细胞折光性强,形态主要为梭形,也见多角形,5 ~ 6 d 细胞基本成融合状,单层生长并有接触抑制现象,符合内皮细胞生长特性,扫描电镜检查可见试漏实验阳性的 BMVEC 细胞汇合成铺路石样(图 1)。透射电镜检查证实细胞间存在紧密连接(图 2A),以及内皮细胞特有的 wp 小体(图 2B)。ZO-1 在细胞连接处阳性表达,表明以上方法获得的细胞为脑微血管内皮细胞,且可形成紧密连接(图 3)。

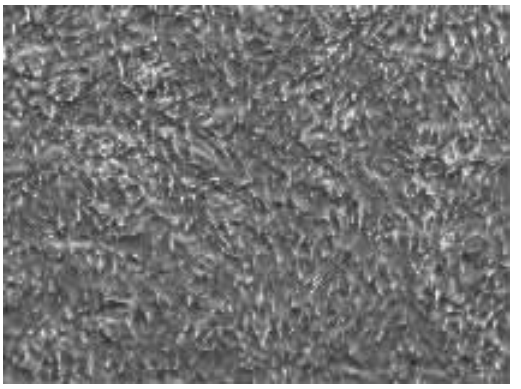
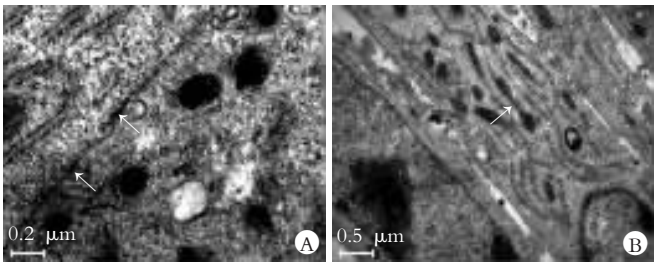


图 1 BMVEC 细胞融合后铺路石样表现 (SEM ×100)



A: 内皮细胞间特有的紧密连接 ↑:紧密连接; B: 内皮细胞特有的 wp 小体 ↑:wp 小体

图 2 单层生长并融合后的 BMVEC 的透射电镜观察

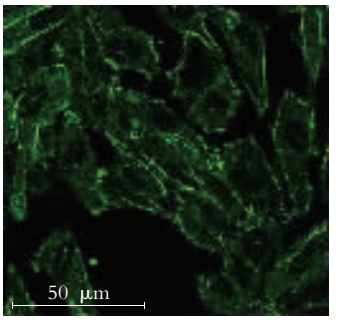


图 3 ZO-1 免疫组化 ABC 法观察紧密连接蛋白表达

2.3 ^{3}H 葡萄糖在 BBB 体外实验模型上的通透率

BBB 初步建立成功的细胞小室 60 h 后行 ^{3}H 葡萄糖通透性实验,以 12 h 内每小时为测量点与 12 h 后每 12 小时为测量点分析检测,共计 20 个时相点,得出的数值减去对照组 ^{3}H 葡萄糖通透值,得到的 ^{3}H 葡萄糖通透值为考查指标。^{3}H 葡萄糖通透性从试漏实验阳性开始计时,即在培养的第 3 天开始通透性逐渐降低并保持在一个平稳水平直至第 7 天开始上升(图 4)。

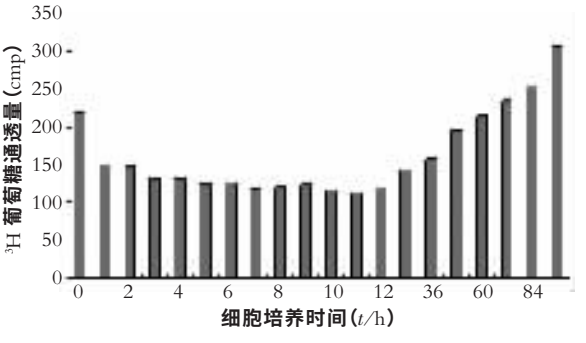


图 4 ^{3}H 葡萄糖在试漏实验阳性后 96 h 通透性变化

2.4　血脑屏障跨膜电阻的测定

用 MILLICELL ERS(美国 Millipore 公司)测定仪分别测定了 BMVEC 在不同汇合状态时的跨膜电阻。结果显示:汇合状态 BMVEC 的跨膜电阻[(346 ± 10) Ω/cm^2, n = 10, P < 0.01]分别为未汇合 BMVEC[(97 ± 5) Ω/cm^2, n = 10, P < 0.01]的 3.75 倍,组间差异显著(P < 0.05),第 3 ~ 7 天跨细胞电阻可以恒定地保持在 180 Ω/cm^{2}以上,这一电阻区间为脑微血管内皮细胞模型(180 ~ 360 Ω/cm^2)紧密连接电阻要求,并且跨细胞电阻越大其通透性越低,通透率最高时接近体外培养的第 7 天,跨细胞电阻降低至[(176 ± 5) Ω/cm^2, n = 10, P < 0.01]。这与^{3}H 葡萄糖通透实验结果相一致。

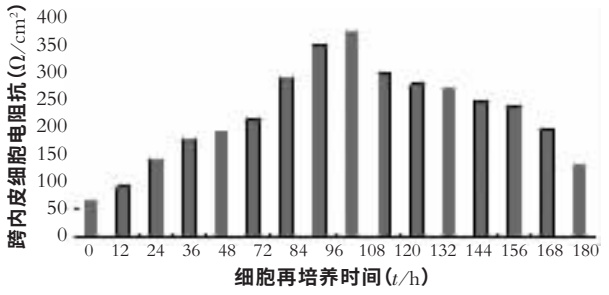


图 5　跨内皮细胞电阻 7 d 变化曲线

3　讨论

目前国内外有大量关于建立体外血脑屏障模型的报道[4-6],建立更加简单、真实的模拟血脑屏障模型以及寻找实时开放血脑屏障的切入点成为解决大分子物质通过血脑屏障而进入中枢神经系统的难题。

本实验通过酶消化、机械分离结合密度离心的方法得到原代 BMVEC,由于 BMVEC 不易贴壁和生长缓慢的特性,因此采用涂有明胶的培养瓶进行进一步纯化和传代培养,经细胞内部结构和形态学鉴定,我们培养得到的 BMVEC 具有较高的纯度。经传代培养证实,生长状况良好,可进行稳定的传代。我们观察到细胞仅在一定的时间内(3 ~ 7 d)保持 BBB 的特性和内皮细胞单层的完整性。因此我们采用培养于细胞小室内的细胞行试漏实验来初步判断血脑屏障的形成。如果在第 3 天行试漏实验过夜后插入器内外仍能够维持明显的液面差,说明水分子已经不能自由通过,血脑屏障已经形成。通过电子显微镜我们进一步证实试漏实验阳性时大多数内皮细胞间已经形成紧密连接,具有含量较高的线粒体和较少的吞饮小泡等脑微血管内皮细胞的形态学特征。BBB 模型对^{3}H 葡萄糖通透率为试漏实验阴性时的 1/6 ,种植 BMVEC 4 d 后 TEER 达到高峰(346 ± 10) Ω/cm^2,达到脑微血管内皮细胞模型(180 ~ 360) Ω/ cm^{2}紧密连接电阻要求,且跨膜电阻为试漏实验阴性时的 3.75 倍。这些结果说明,试漏实验可以作为血脑屏障体外实验模型是否成功建立的早期判断标准。血管内皮细胞的单层汇合和细胞间的紧密连接是血脑屏障重要的形态和结构基础。从形态学上证实了所建立的 BBB 体外模型具备在体 BBB 最重要的形态基础。通透性实验、跨膜电阻等方面进行的研究对比发现,汇合后的 BMVEC 区具有明显的屏障功能,跨细胞电阻越大,其通透性越低,这与^{3}H 葡萄糖通透实验结果一致。结果证实,应用这种方法构建的体外模型具有在体 BBB 的形态、结构和功能特点,可以应用于体外跨血脑屏障靶向药物传输系统的研究。

Cecchelli 等[7]考察了不同膜材对蔗糖的滞留,发现 Millicell-CM 对这种物质的滞留较大。其次是考虑滤膜的孔径。很多实验研究采用孔径为 0.45、3、1 μm 的滤膜进行实验,我们认为这些孔径对物质的过滤也起到了屏障作用,为完全排除孔径对其屏障作用的影响,我们选择了孔径较大的 8 μm Transwell 细胞小室(Falcon 公司)作为细胞培养池,膜面积 0.45 cm^2,且 9 mm 直径正好适宜 24 孔板培养,这与谢英等[8]选择的 7.6 mm 孔径的小室相比,能形成更大的梯度容积检测屏障功能的形成。

本研究采用原代培养分离脑微血管内皮细胞建立 BBB 体外模型,从形态、结构和功能方面进行了初步研究。BMVEC 是 BBB 构成的最主要的细胞,将 BMVEC 在细胞插入器上单独培养至汇合状态,即可以构建 BBB 体外模型。这种模型在形态学、通透性、跨细胞电阻调控等方面具备了在体 BBB 的结构和功能特性,参考电阻与通透性的相关性能够成为实时开放血脑屏障研究的切入点。

参考文献:

[1] Shi LZ, Zheng W. Establishment of an *in vitro* brain barrier epithelial transport system for pharmacological and toxicological study[J]. Brain Res, 2005(1 - 2), 1057: 37 - 48.

[2] Demeuse P, Kerkhofs A, Struys-Ponsar C, *et al*. Compartmentalized coculture of rat brain endothelial cells and astrocytes: a syngenic model to study the blood-brain barrier[J]. J Neurosci Methods, 2002, 121(1): 21 - 31.

[3] Lu W, Zhang Y, Tan YZ, *et al*. Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles as novel drug carrier for brain delivery[J]. J Control Release, 2005, 107(3): 428 - 448.

[4] Culot M, Lundquist S, Vanuxeem D, *et al*. An *in vitro* blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening[J]. Toxicol *In Vitro*, 2008, 22(3): 799 - 811.

[5] 陈剑鸿, 张玉琪, 卞修武. 血脑/血瘤屏障体外模型的构建、形态与功能特性[J]. 中华神经外科杂志, 2006, 22(5): 303 - 305.

[6] 史伟雄, 汪　洋, 罗玉敏, 等. 血脑屏障体外模型的建立与评价[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(19): 1347 - 1349.

[7] Cecchelli R, Dehouck B, Descamps L, *et al*. *In vitro* model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier[J]. Adv Drug Deliv Rev, 1999, 36(2 - 3): 165 - 178.

[8] 谢　英, 叶丽亚, 张小滨, 等. 血脑屏障体外实验模型的建立[J]. 北京大学学报: 医学版, 2004, 36(4): 435 - 438.

(编辑　王小寒)