DOI:10.16016/j.1000-5404.201507013

前列腺毛细血管内皮细胞屏障功能研究

崔 栋[1],尚永刚[1],韩广玮[2],刘城城[3],李龙坤[1],易善红[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院泌尿外科[1];421002 湖南 衡阳,解放军第169医院泌尿外科[2];400014 重庆,重庆市第四人民医院泌尿外科[3])

[**摘要**] **目的** 分离培养大鼠前列腺毛细血管内皮细胞,体外研究大鼠前列腺毛细血管内皮细胞的屏障功能。**方法** 采用细胞生长特性选择法分离培养大鼠前列腺毛细血管内皮细胞,用第Ⅷ因子相关抗原抗体对分离培养的前列腺毛细血管内皮细胞进行免疫学鉴定。免疫组化观察毛细血管内皮细胞之间紧密连接蛋白 claudin-1 的表达,采用跨膜电阻测量仪检测毛细血管内皮细胞的跨膜电阻,用酚红渗漏实验检测其通透性,以大鼠肺毛细血管内皮细胞、脑毛细血管内皮细胞作为阴性与阳性对照。**结果** 成功分离大鼠前列腺毛细血管内皮细胞,体外培养可以形成紧密的单层细胞结构,呈铺路石样生长。第Ⅷ因子相关抗原抗体的免疫荧光结果显示:分离培养的大鼠前列腺毛细血管内皮细胞胞浆表达绿色荧光,提示分离的细胞为毛细血管内皮细胞;免疫组化结果显示紧密连接蛋白 claudin-1 在相邻的毛细血管内皮细胞之间表达;体外培养的大鼠前列腺毛细血管内皮细胞,阴性对照组肺毛细血管内皮细胞,阳性对照组脑毛细血管内皮细胞的跨膜电阻峰值分别可以达到(142.2±3.1)、(43.3±3.5)、(248.2±6.2)Ω/cm^2,并稳定保持2~3 d,三者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。酚红渗漏实验结果显示前列腺毛细血管内皮细胞、阳性对照组脑毛细血管内皮细胞随着细胞单层跨膜电阻的增加,基底侧的酚红浓度减低,阴性对照组肺毛细血管内皮细胞酚红渗透量随跨膜电阻的改变变化趋势不明显。**结论** 大鼠前列腺毛细血管内皮细胞与脑毛细血管内皮细胞等屏障内皮相比拥有相似的结构功能,体外培养的大鼠前列腺毛细血管内皮细胞具有屏障特性,可以作为血前列腺屏障研究的体外模型。

[**关键词**] 前列腺;毛细血管内皮细胞;血前列腺屏障;跨膜电阻
[**中图法分类号**] R322.13;R322.64;R329.27 [**文献标志码**] A

Barrier function of rat prostate capillary endothelial cells *in vitro*

Cui Dong[1], Shang Yonggang[1], Han Guangwei[2], Liu Chengcheng[3], Li Longkun[1], Yi Shanhong[1] ([1]Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Urology, No. 169 Hospital of PLA, Hengyang, Hunan Province, 421002; [3]Department of Urology, Fourth People's Hospital of Chongqing, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To culture rat prostate capillary endothelial cells *in vitro*, and study their barrier function. **Methods** The rat prostate capillary endothelial cells were isolated and cultured with cell growth feature selection method. Antibody against Ⅷ factor related antigen was used for immunological identification of prostate capillary endothelial cells. Immunohistochemistry was adopted to observe the expression of tight junction protein claudin-1. Millicell epithelial resistance measuring instrument was employed to measure the transepithelial electrical resistance of the capillary endothelial cells, and phenol red leakage test was used to detect the permeability of prostate capillary endothelial cells. The rat pulmonary capillary endothelial cells and brain capillary endothelial cells were taken as negative control and positive control respectively. **Results** The rat prostate capillary endothelial cells were successfully isolated and cultured to form compact monolayer cell structure *in vitro*. The immunofluorescence detection of factor Ⅷ showed that the cultured cells were factor Ⅷ-positive and green fluorescence was expressed. Immunohistochemical results showed that the tight junction protein claudin-1 was expressed between adjacent endothelial cells. The transepithelial electrical resistance peaks of *in vitro* cultured rat prostate capillary

[**基金项目**] 第三军医大学临床科研基金(2014D325)
[**通信作者**] 易善红,E-mail:yshh881@aliyun.com.cn
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160118.1507.001.html(2016-01-18)

endothelial cells, negative control pulmonary capillary endothelial cells and positive control brain capillary endothelial cells reached 142.20 ± 3.10, 43.3 ± 3.5 and 248.20 ± 6.0 Ω/cm^2, respectively, and stably kept for 2 ~ 3 d, and there were statistically significant differences between the 3 groups of cells ($P<0.05$). Phenol red leakage test showed that with the increase of the transepithelial electrical resistance, the concentration of phenol red in basal lateral region of prostate capillary endothelial cells and positive control brain capillary endothelial cells was reduced. However, in negative control pulmonary capillary endothelial cells, the change trend of phenol red in basal lateral region was not obvious. **Conclusion** The rat prostate capillary endothelial cells have similar structure and function with brain capillary endothelial cells. Prostate capillary endothelial cells cultured *in vitro* have certain barrier properties, and can be used as a research model of blood prostate barrier *in vitro*.

[**Key words**] prostate; capillary endothelial cells; blood prostate barrier; transepithelial electrical resistance

Supported by the Clinical Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2014D325). Corresponding author: Yi Shanhong, E-mail: yshh881@aliyun.com.cn

慢性前列腺炎是泌尿外科的常见疾病,但是前列腺炎的药物治疗效果很差,对患者的心理生理造成巨大的损害[1]。正是由于血前列腺屏障的存在,才使慢性前列腺炎迁延不愈。

目前关于血前列腺屏障的研究较少,血前列腺屏障的组成还不是很清楚,因此针对血前列腺屏障的研究对于前列腺疾病的治疗有重要的意义[2]。对于已经证实的血脑屏障,Veksler 等[3]证实毛细血管内皮细胞在血脑屏障的屏障特性方面起重要作用。大脑在发育过程中,毛细血管通过分化、发育成熟形成血脑屏障[4],其渗透性一般是由脑毛细血管内皮细胞的生物化学特性决定的[5-6]。同样对于血迷路屏障[7]与血眼屏障[8]有研究指出毛细血管内皮细胞是构成这些屏障的关键结构。关于前列腺毛细血管内皮细胞有研究提示前列腺毛细血管内皮细胞之间不存在窗孔,结构功能与血脑屏障、血睾屏障、血附睾屏障、血眼屏障相似[9]。因此毛细血管内皮细胞可能也参与了血前列腺屏障的组成。本研究参考血脑屏障[10-12]、血眼屏障、肠上皮屏障[13-18]的研究方法对前列腺毛细血管内皮的一些特性进行分析,探讨毛细血管内皮细胞在血前列腺屏障中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

细胞培养相关试剂包括 DMEM 培养基(美国 HyClone 公司),胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),claudin-1 兔抗人多克隆抗体(美国 Sigma 公司),第Ⅷ因子相关抗原抗体(美国 Sigma 公司)PBS 缓冲液(武汉博士德公司)。24 孔板 Transwell 小室,膜孔径 0.4 μm(美国 Millipore 公司),Millicell-ERS 电阻测量仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 实验动物

雄性 1 ~ 2 月龄 SD 大鼠 3 只,清洁级,体质量 80 ~ 120 g,由第三军医大学实验动物中心提供(SCXK20120013)。

1.3 实验细胞株

对照组正常 SD 大鼠肺毛细管内皮细胞、脑毛细血管内皮细胞购自中科院细胞库。

1.4 方法

1.4.1 实验分组 以分离的 SD 大鼠前列腺毛细血管内皮细胞为实验组,以正常 SD 大鼠肺毛细血管内皮细胞与脑毛细血管内皮细胞株分别为阴性与阳性对照组。

1.4.2 前列腺毛细血管内皮细胞的体外培养 根据细胞生长特性选择法分离培养大鼠前列腺毛细血管内皮细胞:SD 大鼠体质量 80 ~ 120 g,腹腔注射 3% 戊巴比妥钠注射液(30 mg/kg)麻醉后,腹腔注射 1 000 U 的肝素,进行肝素化。切断大鼠双侧颈动脉进行放血,使用 PBS 缓冲液冲洗残存于前列腺微循环中的血。无菌操作下取大鼠前列腺组织,将前列腺组织切成 1 mm × 1 mm × 1.5 mm 小块。将小组织块放入含有 20% 的胎牛血清的 DMEM 培养基中,按每 45 cm^2 放入 10 块接种。培养 60 h 后,抛弃培养瓶中的小组织块。在第 6、10 天进行传代培养。细胞生长曲线观察:将细胞以 5×10^4/mL,分别接种于 7 只 50 mL 培养瓶中常规培养,以后每天取 1 瓶细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞,用白细胞计数法计算每瓶细胞每毫升活细胞数,一共观察 7 d,并画出生长曲线。

1.4.3 免疫荧光 将前列腺毛细血管内皮细胞接种于盖玻片上,常规冲洗、固定、加封闭液孵育后,加一抗第Ⅷ因子相关抗原抗体,孵育,清洗后滴加 FITC 标记羊抗兔二抗,孵育、清洗、封片后荧光显微镜下观察。

1.4.4 免疫组化 将接种有前列腺毛细血管内皮细胞的盖玻片常规冲洗、固定、加封闭液孵育后,加一抗 claudin-1,孵育,常规冲洗后加二抗孵育,显色、复染、脱水干燥、封固后显微镜下观察。

1.4.5 细胞跨膜电阻的测量 将 30 个 Transwell 小

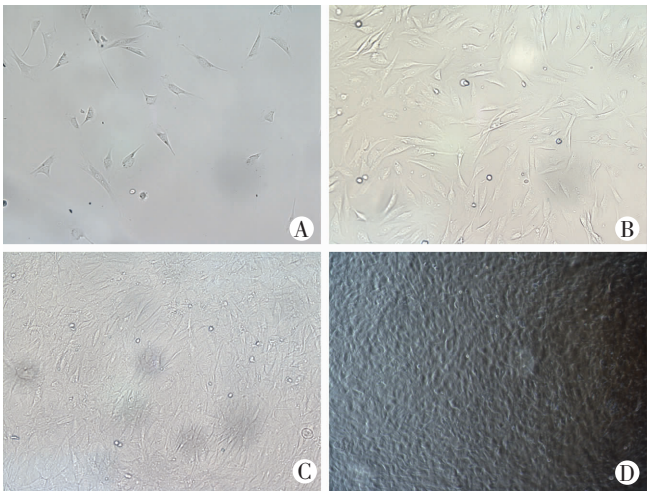
室放入24孔板,将大鼠前列腺毛细血管内皮细胞,肺毛细血管内皮细胞,脑毛细血管内皮细胞以$5.0\times10^6/cm^2$分别接种于10个Transwell小室PET膜上,上室加培养液250 μL,下室加入1 150 μL,保持上下室液面相平。于接种后第2天开始每天用Millicell跨上皮电阻测定系统检测细胞单层在不同汇合状态时的跨膜电阻值(TEER)。并设1孔无细胞接种的Transwell小室作为对照,测得其电阻值作为滤过层的TEER。3组单层细胞的电阻值为实测值减去滤过层的电阻值。

1.4.6　酚红渗漏实验　　分别在Transwell小室的细胞单层上室加入含80 μg/mL酚红的HEPES溶液50 μL,并加入内皮细胞培养液200 μL。下室加入内皮细胞培养液1 150 μL使内外液面相平,分别于细胞接种第2天收集100 μL下室侧溶液,然后将上下室培养基倒入废液缸,用PBS缓冲液清洗上下室,共3次,加入相同体积的培养基及酚红溶液,同时进行跨膜电阻的测量。样品中酚红的含量用分光光度法测定(波长为560 nm)。

2　结果

2.1　前列腺毛细血管内皮细胞的分离培养

成功分离大鼠前列腺毛细血管内皮细胞,装有前列腺小组织块的细胞培养瓶,在培养60 h后倒掉前列腺小组织块,可见少量团块状的细胞贴壁,瓶底有散在贴壁的细胞,细胞呈梭形,有1~2个轴突,3 d后细胞数量增多,5 d后可见细胞形成紧密的单层,7 d后低倍镜下可见细胞成铺路石样表现,呈现典型的内皮细胞生长形态。传代细胞0.5~2 h贴壁80%~90%,3~4 d长满瓶壁,有1~2个轴突,呈铺路石样排列生长(图1)。



A:60 h后倒掉前列腺小组织块,可见瓶底呈梭形生长的前列腺微血管内皮细胞贴壁,有1~2个轴突(×100);B:培养3 d后可见细胞数量明显增多(×100);C:培养5 d后可见细胞形成紧密的单层结构(×100);D:培养7 d后低倍镜下可见细胞成铺路石样生长,呈典型的内皮细胞生长形态(×40)

图1　体外培养大鼠前列腺毛细血管内皮细胞

2.2　细胞生长曲线

传代细胞培养3 d后可见细胞生长旺盛,进入指数生长期(图2)。

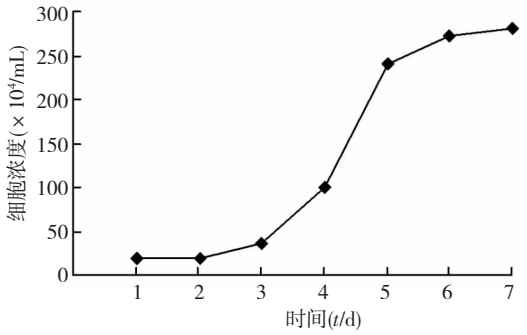


图2　大鼠前列腺毛细血管内皮细胞生长曲线

2.3　大鼠前列腺毛细血管内皮细胞的鉴定

第Ⅷ因子相关抗原抗体的免疫荧光检测结果显示,分离培养的大鼠前列腺内皮细胞胞浆表达绿色荧光,提示分离的细胞为毛细血管内皮细胞(图3)。

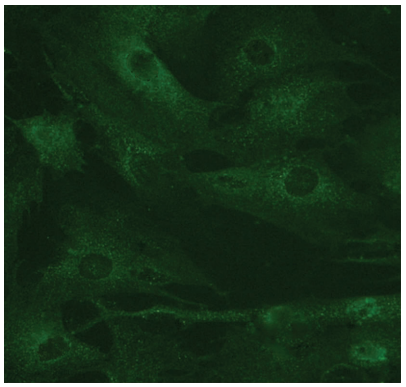


图3　免疫荧光观察大鼠前列腺毛细血管内皮细胞第Ⅷ因子相关抗原抗体的表达　(×100)

2.4　大鼠前列腺毛细血管内皮细胞的免疫组化

体外培养的内皮细胞可以形成紧密的单层细胞结构,紧密连接蛋白在相邻的毛细血管内皮细胞之间表达(图4)。

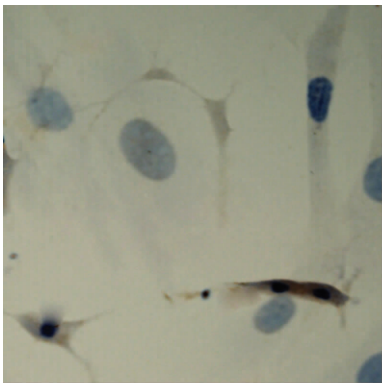
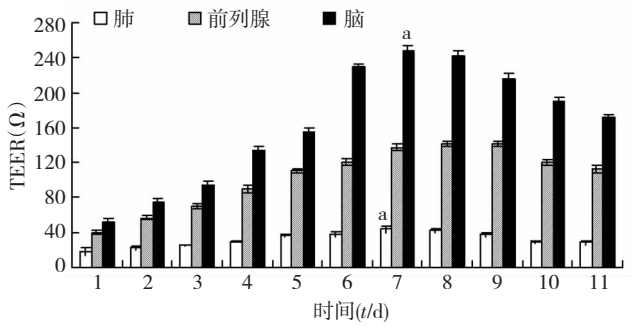


图4　免疫组化观察紧密连接蛋白claudin-1的表达
(S-P ×100)

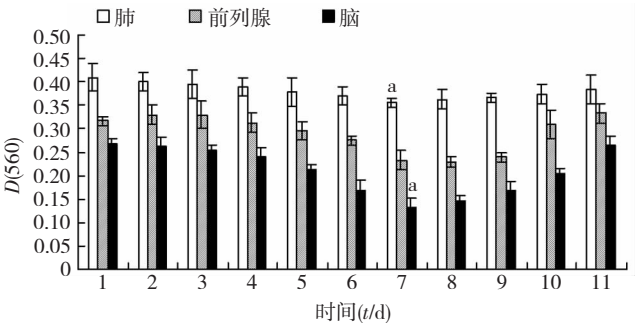
2.5 前列腺、肺与脑毛细血管内皮细胞跨膜电阻的测定与渗漏实验

Millicell ERS 测量仪检测前列腺毛细血管内皮细胞的跨膜电阻,结果显示前列腺毛细血管内皮细胞的跨膜电阻在培养第 2 天电阻值为(40.3 ± 2.3) Ω/cm^2,在培养第 3 天细胞开始融合后电阻值为(56.5 ± 2.3) Ω/cm^2,在培养第 9 天电阻值可以达到最大(142.2 ± 3.1) Ω/cm^2,并稳定保持 2 ~ 3 d,在第 10 天后跨膜电阻值逐渐降低(图 5)。阴性对照组肺毛细血管内皮细胞与阳性对照组脑毛细血管内皮细胞的跨膜电阻峰值分别为(43.3 ± 3.5)、(248.2 ± 6.2) Ω/cm^2,与前列腺毛细血管内皮细胞的跨膜电阻峰值相比较,三者差异有统计学意义($P < 0.05$)。酚红渗漏实验结果显示,前列腺毛细血管内皮细胞、阳性对照组脑毛细血管内皮细胞的酚红渗透量随着细胞单层跨膜电阻的增加,基底侧的酚红浓度减低,阴性对照组肺毛细血管内皮细胞酚红渗透量随跨膜电阻值的变化趋势不明显(图 6)。



a:$P < 0.05$,与 7 d 时前列腺毛细血管内皮细胞跨膜电阻峰值比较

图 5 大鼠前列腺、肺、脑毛细血管内皮细胞跨膜电阻值的变化



a:$P < 0.05$,与 7 d 时前列腺毛细血管内皮细胞酚红渗透量比较

图 6 大鼠前列腺、肺、脑毛细血管内皮细胞酚红渗透量的变化

3 讨论

对于机体血组织屏障的研究,目前研究发现,毛细血管内皮细胞在机体的各种屏障的形成过程中发挥着重要的作用。有学者研究证实中枢器官,如脑的微血管内皮多为无窗型内皮,吞饮囊泡较少,细胞之间可以形成广泛而紧密的连接[19],对大分子物质不通透。因此,这类微血管内皮被称之为屏障型内皮细胞。紧密连接(tight junction,TJ)蛋白是构成血脑屏障、血眼屏障以及血睾屏障[20]的重要结构。跨内皮电阻(trans-endothelial electrical resistance, TEER)是常用的评价 TJ 完整性的指标,TEER 的测量和渗漏实验可间接地反映屏障功能的建立情况。

TEER 作为衡量紧密连接蛋白完整性的指标,有研究将脑微血管内皮[21-22]与其他内皮细胞的 TEER 进行比较后提出,该值的大小反映了各种内皮细胞屏障能力的不同,有报道在血眼屏障视网膜微血管内皮细胞的跨膜电阻值为(120.62 ± 3.97) Ω/cm^2。在血迷路屏障内耳的微血管内皮细胞峰值可以达到(118.9 ± 18.5) Ω/cm^2。张水华等[23]报道,在血脑屏障模型,脑血管内皮细胞的跨膜电阻值为(373 ± 41) Ω/cm^2。本实验阳性对照组大鼠脑毛细血管内皮细胞的跨膜电阻峰值为(248.2 ± 6.2) Ω/cm^2,而不具有屏障功能的阴性对照组肺毛细血管内皮细胞跨膜电阻值只有(43.3 ± 3.5) Ω/cm^2。一般来讲血脑屏障体外模型的跨膜电阻值要求达到 180 ~ 300 Ω/cm^2。然而,不同组织器官所发挥的生理功能不同,屏障功能应该有所不同。血眼屏障以及血迷路屏障的电阻峰值就明显小于血脑屏障。本实验中大鼠前列腺毛细血管内皮细胞的跨膜电阻峰值为(142.2 ± 3.1) Ω/cm^2,该数值虽然小于脑毛细血管内皮细胞,但大于血眼屏障、血迷路屏障的跨膜电阻值,同时远远大于不具有屏障功能的肺毛细血管内皮细胞。并且大鼠前列腺微血管内皮细胞与脑微血管内皮细胞跨膜电阻的变化趋势是一致的,都随着单层细胞通透型的降低而增加,随着单层内皮细胞通透性的增加而降低,而作为外周内皮的肺毛细血管内皮酚红的渗透量随跨膜电阻的变化趋势不明显,且其跨膜电阻峰值较小。提示前列腺毛细血管内皮细胞可能在血前列腺屏障的屏障功能中发挥重要的作用。

本实验前列腺毛细血管内皮细胞的跨膜电阻值以及通透性等与屏障性内皮细胞具有相似性,提示前列腺毛细血管内皮细胞可能参与了血前列腺屏障的组成,体外模型的建立可以为前列腺疾病的研究提供模型。然而目前对于屏障的研究包括多种方法,采用不同类型的细胞,如肠上皮屏障,就普遍采用人结肠腺癌细胞系(Caco-2)[13-18],并且该模型已被广泛应用于药物研究与开发。对于血脑屏障有各种共培养模型[24-26]用于血脑屏障的研究。因此对于血前列腺屏障的研究,目前难点很多,例如血前列腺屏障的组成包括哪些结构,血前列腺屏障研究要采用哪种方法,哪种类型以及种属的细胞,使得建立的体外模型更接近活体组织的生理状态,还需要进一步的研究。

参考文献:

[1] 张斌斌, 白安胜. 慢性前列腺炎的发病机制及治疗进展[J]. 疑难病杂志,2014, 13(3): 326 - 329. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2014.03.041

[2] Li T, Liu G, Li J, *et al*. Mechanisms of prostate permeability triggered by microbubble-mediated acoustic cavitation[J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 64(2): 147 - 153. DOI:10.1007/s12013-012-9383-9

[3] Veksler R, Shelef I, Friedman A. Blood-brain barrier imaging in human neuropathologies[J]. Arch Med Res, 2014, 45(8): 646 - 652. DOI:10.1016/j.arcmed.2014.11.016

[4] Nishimura Y, Yata K, Nomoto T, *et al*. Identification of a novel indoline derivative for *in vivo* fluorescent imaging of blood-brain barrier disruption in animal models[J]. ACS Chem Neurosci, 2013, 4(8): 1183 - 1193. DOI:10.1021/cn400010t

[5] Bicker J, Alves G, Fortuna A, *et al*. Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: a review[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2014, 87(3): 409 - 432. DOI:10.1016/j.ejpb.2014.03.012

[6] Thanabalasundaram G, Schneidewind J, Pieper C, *et al*. The impact of pericytes on the blood-brain barrier integrity depends critically on the pericyte differentiation stage[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(9): 1284 - 1293. DOI:10.1016/j.biocel.2011.05.002

[7] 吴永翔, 朱国霞, 刘新秦, 等. 噪声对豚鼠耳蜗血管纹紧密连接蛋白 claudin-5 表达及血迷路屏障通透性的影响[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2012, 20(2):145 - 150. DOI:10.3969/j.issn.1006-7299.2012.02.015

[8] Forrester J V, Xu H. Good news-bad news: the Yin and Yang of immune privilege in the eye[J]. Front Immunol, 2012, 3: 338. DOI:10.3389/fimmu.2012.00338

[9] Lee K S, Choi J D. Chronic prostatitis: approaches for best management[J]. Korean J Urol, 2012, 53(2): 69 - 77. DOI:10.4111/kju.2012.53.2.69

[10] 王新施, 朱攀, 朱振国, 等. 咪唑克生对体外血脑屏障炎症模型通透性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(4): 669 - 674. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2014.12.024

[11] Zhou J X, Ding G R, Zhang J, *et al*. Detrimental effect of electromagnetic pulse exposure on permeability of *in vitro* blood-brain-barrier model[J]. Biomed Environ Sci, 2013, 26(2): 128 - 137. DOI:10.3967/0895-3988.2013.02.007

[12] Mahajan S, Parikh N U, Woodruff T M, *et al*. C5a alters blood-brain barrier integrity in a human *in vitro* model of systemic lupus erythematosus[J]. Immunology, 2015, 146(1): 130 - 143. DOI:10.1111/imm.12489

[13] Stetinova V, Smetanova L, Kholova D, *et al*. The effect of probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 lipopolysaccharide on the 5-aminosalicylic acid transepithelial transport across Caco-2 cell monolayers[J]. Gen Physiol Biophys, 2013, 32(3): 371 - 380. DOI:10.4149/gpb_2013035

[14] 戴丽娜, 侯龙龙, 黄璜, 等. 生理浓度丁酸钠对 Caco-2 细胞肠屏障作用中 JNK 通路的效应[J]. 中华小儿外科杂志, 2014, 35(11): 859 - 864. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2014.11.014

[15] 曹敏, 黄家君. 小檗碱减轻炎症反应时肠上皮屏障功能损害的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(5): 447 - 450.

[16] 郑琴, 周欢, 熊文海, 等. 乌头碱在 Caco-2 细胞模型上的转运行为[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(20): 121 - 124. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.2014200121

[17] Shi L L, Cao Y, Zhu X Y, *et al*. Optimization of process variables of zanamivir-loaded solid lipid nanoparticles and the prediction of their cellular transport in Caco-2 cell model[J]. Int J Pharm, 2015, 478(1): 60 - 69. DOI:10.1016/j.ijpharm.2014.11.017

[18] Sanchez-Bridge B, Leveques A, Li H, *et al*. Modulation of (-)-epicatechin metabolism by coadministration with other polyphenols in Caco-2 cell model[J]. Drug Metab Dispos, 2015, 43(1): 9 - 16. DOI:10.1124/dmd.114.060590

[19] Ogunshola O O. *In vitro* modeling of the blood-brain barrier: simplicity versus complexity[J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(26): 2755 - 2761.

[20] Vogl A W, Young J S, Du M. New insights into roles of tubulobulbar complexes in sperm release and turnover of blood-testis barrier[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2013, 303: 319 - 355. DOI:10.1016/B978-0-12-407697-6.00008-8

[21] 田蓉, 刘秋慧, 蔡萌, 等. 过表达 Claudin-5 增强体外培养的人视网膜微血管内皮细胞屏障功能[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2014, 35(5): 695 - 701.

[22] 查雨锋, 傅晓钟, 张顺, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞与周细胞、星形胶质细胞共培养建立体外血脑屏障模型[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(5): 730 - 735.

[23] 张水华,季龙凤,马璟. 非接触式共培养体外血脑屏障模型的跨膜电阻及通透性[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(6): 882 - 887. DOI:10.3867/j.issn.1000-3002.2012.06.018

[24] Xue Q, Liu Y, Qi H, *et al*. A novel brain neurovascular unit model with neurons, astrocytes and microvascular endothelial cells of rat[J]. Int J Biol Sci, 2013, 9(2): 174 - 189. DOI:10.7150/ijbs.5115

[25] 陈雪, 王军, 王伟, 等. 体外血脑屏障模型的建立及功能测定[J]. 卒中与神经疾病, 2014, 21(4): 195 - 198, 202. DOI:10.3969/j.issn.1007-0478.2014.04.001

[26] 赵康峰, 王翀, 孔建, 等. 不同血脑屏障模型的建立及其功能特点[J]. 环境与健康杂志,2012,29(2): 127 - 130,封 3.

(**收稿**:2015-07-03;**修回**:2015-08-06)

(编辑 龙 亮)