离，而使用胶原酶/分散酶进行第二次消化可以进一步将微血管片段上的杂细胞（周细胞、胶质细胞等）去除；在酶消化时间的把握上，我们发现以往文献[4]采用的 1 h 或 1.5 h 的消化时间过长，常常使获得的细胞活性大大受损，甚至得不到完整的微血管段，而我们通过反复实验发现 30 min 的消化时间既保证内皮细胞的活性又可以较好的将杂细胞去除，能获得完整的串珠样的微血管段；同时 20% 牛血清白蛋白密度介于微血管片段和杂细胞之间，能达到再次纯化微血管片段的目的。另外，高纯度 BMECs 的良好生长也是实验的关键：明胶涂布的塑料培养瓶可以较好地促进 BMECs 的贴壁；然而实验中我们发现，按以往的方法[4]培养基中仅仅添加 bFGF，常出现细胞不能顺利传代或酶消化传代后细胞不能良好生长，故我们将 VEGF 和 bFGF 联合添加，为内皮细胞提供了良好的细胞因子生长条件，也使细胞在传代以后继续保持良好的生长状态；而传代换液时采用分次收集消化液，只收集最先消化脱落的细胞进行培养，这是因为与其他杂细胞相比，内皮细胞具有在胰酶消化时容易脱落的特性。

培养的 BMECs 呈短梭形和多角形，待细胞汇合并形成紧密接触后细胞呈较均一的铺路石样，细胞呈单层生长，这些均符合内皮细胞的形态特征；而Ⅷ因子相关抗原作为内皮的特异性标志，在培养的细胞中呈高度阳性表达，进一步证实了所培养细胞为内皮细胞。CCK-8 的测定表明，细胞生长高峰在 3 ~ 6 d；而 TEER 测量的结果表明培养的细胞具有脑微血管内皮细胞高跨内皮阻抗的特性，但传至四代以后 TEER 值明显下降，故对于构建血脑屏障模型，宜采用第四代以前的细胞。

本研究通过匀浆、酶消化和梯度离心等技术手段分离和获取纯度较高的大鼠脑微血管内皮细胞，为进一步研究脑微血管和血脑屏障的生理、病理机制和药理研究提供了有力工具。

**关键词**：脑；微血管内皮细胞；细胞培养；大鼠

**中图法分类号**：R329 - 33　　**文献标识码**：B

**参考文献：**

[1] Kallmann B A, Wagner S, Hummel V, *et al*. Characteristic gene expression profile of primary human cerebral endothelial cells [J]. FASEB J, 2002, 16(6): 589 - 591.

[2] Hawkins B T, Davis T P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease[J]. Pharmacol Rev, 2005, 57(2): 173 - 185.

[3] Chen L, Kis B, Hashimoto H, *et al*. Adrenomedullin 2 protects rat cerebral endothelial cells from oxidative damage in vitro [J]. Brain Res, 2006, 1086(1): 42 - 49.

[4] 许熊飞，李润平，李　泉，等. 大鼠脑微血管内皮细胞的分离与原代培养[J]. 细胞生物学杂志，2005，27(1)：84 - 88.

[5] Lou J, Gasche Y, Zheng L, *et al*. Differential reactivity of brain microvascular endothelial cells to TNF reflects the genetic susceptibility to cerebral malaria[J]. Eur J Immunol, 1998, 28(12): 3989 - 4000.

[6] Jeliazkova-Mecheva V V, Hymer W C, Nicholas N C, *et al*. Brief heat shock affects the permeability and thermotolerance of an *in vitro* blood-brain barrier model of porcine brain microvascular endothelial cells[J]. Microvasc Res, 2006, 71(2): 108 - 114.

[7] 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.

[8] Ishitsuka K, Hideshima T, Hamasaki M, *et al*. Honokiol overcomes conventional drug resistance in human multiple myeloma by induction of caspase-dependent and -independent apoptosis[J]. Blood, 2005, 106(5): 1794 - 1800.

[9] Inglis V I, Jones M P, Tse A D, *et al*. Neutrophils both reduce and increase permeability in a cell culture model of the blood-brain barrier [J]. Brain Res, 2004, 998(2): 218 - 229.

[10] 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.

（编辑　栾　嘉）

## 《军医大学学报（英文版）》欢迎投稿

*Journal of Medical Colleges of PLA* 是由 3 所军医大学和南方医科大学共同主办的、国内外公开发行的综合性医学学术类英文期刊，是中国英文版科技论文统计源期刊，并被纳入中文科技期刊数据库、中国期刊网、万方数据库、重庆维普数据库。国内统一刊号：31 - 1002/R，国际标准刊号：ISSN 1000 - 1948。双月刊。设有论著、技术与方法、个案报道、交流等栏目。若无彩图，无需缴纳版面费；亦不收取审稿费；无稿酬。投稿要求：中（或大摘要）、英文稿各 1 份，照片提供 3 份。电子投稿 E-mail：kimliu@ mail. tmmu. com. cn。照片需以附件形式单独提供 JPG 或 TIF 格式。电子投稿请注明英文版。

**联系地址**：重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部（400038）　　**电话**：（023）68752782