DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.09.025
第24卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 9
2002年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)09-1056-03

豚鼠耳蜗微血管内皮细胞体外通透性的研究

魏运军,张学渊 (第三军医大学附属西南医院耳鼻咽喉科,重庆 400038)

提 要:目的 研究豚鼠耳蜗微血管内皮细胞的体外通透性特征。方法 在成功建立豚鼠耳蜗微血管内皮细胞体外通透性模型的基础上,研究该体外模型跨细胞电阻及对^{125}I-牛血清白蛋白的通透性。结果 ①耳蜗微血管内皮细胞在培养增殖过程中其跨细胞电阻呈动态变化过程,以5×10^4/cm^{2}的细胞密度接种时,7 d左右电阻到达峰值,其跨细胞电阻峰值大小为(118.9±18.5)Ω/cm^2;②体外模型中加入^{125}I-牛血清白蛋白后,其通透性呈上升期抛物线型曲线,90 min内几乎呈直线。结论 跨细胞电阻及对^{125}I-牛血清白蛋白变化曲线能反映体外耳蜗微血管内皮细胞的通透性特征。

关键词:豚鼠;内皮细胞;体外模型;通透性;跨细胞电阻;牛血清白蛋白
中图法分类号:R322.13;R322.92 文献标识码:A

Permeability *in vitro* of cochlear microvascular endothelial cells from guinea pigs

WEI Yun-jun, ZHANG Xue-yuan (Department of Otorhinolaryngology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the permeability *in vitro* of the cochlear microvascular endothelial cells (CMEC) isolated from guinea pigs. Methods By the established model for the permeability of CMEC *in vitro*, the transendothelial electric resistance (TEER) and permeability on radioiodinated ^{125}I bovine serum album (RISA) were studied. Results ①The TEER changed dynamically and reached a peak of (118.9±18.5) Ω/cm^2 in 7 d after inoculation of cultured cells at a primary concentration of 5×10^4/cm^2; ②After RISA administration, the permeability curve displayed an ascending parabola, while within 90 min changed into a straight line. Conclusion The TEER and the curve of RISA reveal the permeability of CMEC *in vitro*.

Key words: endothelial cells; model *in vitro*; permeability; transendothelial electric resistance; bovine serum album; guinea pigs

血迷路屏障的作用在于保持内耳微环境的稳定,从而保证内耳行使正常生理功能,同时其通透性异常也是某些内耳疾病发病机制的重要环节,因此,研究血迷路屏障的通透性特点及其调控机制具有重要意义。耳蜗血管纹等特定部位的微血管内皮细胞是构成血迷路屏障的基础,本实验成功分离培养豚鼠耳蜗微血管内皮细胞、建立起了该内皮细胞通透性体外模型的基础上,将这一体外模型的跨细胞电阻,以及对^{125}I标记的牛血清白蛋白的通透性特点进行了探索研究,为今后开展血迷路屏障体外调控机制研究打下了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 兔抗人八因子相关抗原(Ⅷ-R Ag)多克隆抗体试剂盒由北京中山生物技术有限司生产。

1.1.2 Millicell(底部为多聚醋酸酯滤膜的培养碟,底面积为4.2 cm^2,微孔直径为0.4μm,由Millipore公司生产)使用前滤膜上分别涂以醋酸鼠尾胶原和粘连蛋白(Roche)液。

1.1.3 碘化钠(Na^{125}I)购于中国核动力研究设计院第一研究所。将牛血清白蛋白溶于PBS中,加入氧化剂氯甘脲后注入Na^{125}I震荡、上柱、层析、分离,收集产品配成放射浓度为剂氯甘脲后注入100μci/ml的工作液。

1.2 方法

1.2.1 微血管内皮细胞通透性体外模型的构建 作者于前期研究中,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[1]。

参照国外学者研究血脑屏障通透性体外模型的方法[2],将耳蜗微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,外池为六孔培养板的培养孔。使用时将Millicell放入培养孔中,Co^{60}照射灭菌后,向内池中按5×10^4/cm^{2}的细胞密度接种豚鼠耳蜗微血管内皮细胞悬液,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时,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,待用。

1.2.2 体外模型的跨细胞电阻(TEER) 参照Martha等[3]检测脑血管内皮细胞单层电阻的方法,两片电极分别置于滤膜表面及滤膜下,六只Millicell中各注入2.8 ml含胎牛血清的DMEM培养液,用Tenica五位多用电表测量每只Millicell的基础电阻值,尔后将培养细胞消化、离心,细胞计数,按5×10^4/cm^{2}的密度接种于上述测定装置的Millicell中,分别在2、4、6、7、8、9、10、12、14 h测量其电阻值,减去各自的基础电阻后除以Millicell的底面积4.2 cm^2,即获得了3组细胞的跨细胞电阻值(单位:Ω/cm^2),绘制TEER-时间曲线,了解豚鼠耳蜗微血管内皮细胞TEER的动态变化规律。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870834)
作者简介:魏运军(1965-),男,湖北省武汉市人,主治医师,讲师,主要从事内耳微循环研究。电话:(023)68752579
收稿日期:2001-12-15;修回日期:2002-05-11
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.3　体外模型对^{125}I-牛血清白蛋白(RISA)的通透性　　取待用模型, 向内池和外池中分别加不含血清的 DMEM 培养液, 同时向内池中加入 RISA 工作液 3 ml 300 μci, 放入 5%CO_2, 37 ℃之培养箱中培养, 分别于 15、30、45、60、75、90、120、240 min 时从外池中取液 5 μl, 及时检测其每分钟放射强度计数, 计算出其贝克(Bake)值[4], 绘制 Bake-时间曲线, 即耳蜗内皮细胞对 RISA 的通透性曲线。

该通透性研究用不加细胞的 Millicell 设为空白对照, 样本数均为 6。

2　结果

2.1　耳蜗内皮细胞的跨细胞电阻

发现耳蜗内皮细胞接种(5×10^4/cm^2)4 d 后, TEER 值快速上升, 7 d 达到最高, 为(118.9±18.5)Ω/cm^2(n=6), 维持 2 d 后缓慢下降, 见图 1。

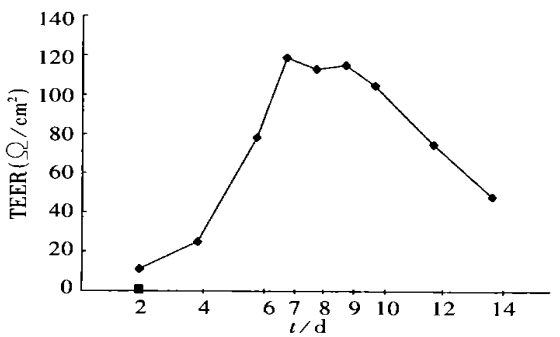


图 1　耳蜗内皮细胞 TEER 动态变化图

Fig 1　Dynamical changes of TEER of cultured cochlear endothelial cells

2.2　耳蜗内皮细胞通透性体外模型对 RISA 的通透性

实验组及空白对照组通透性曲线均呈上升期抛物线型, 见图 2。经统计学(SSPS8.0)各种曲线拟合, 均以二次曲线拟合最佳, 曲线拟合方程分别为 $y=52.31+4.76x-0.01x^2$ (R=0.996), $y=28.46=8.08\times0.02x^2$ (R=0.994)。同时前 90 min 内上升几乎呈直线, 可得到直 1 线回归方程, 分别是 $y=32.60+3.95x$ (R=0.997), $y=58.13+6.14x$ (R=0.998)。使用两组配对 t 检验, 实验组与空白对照组在各个时间点上对 RISA 的通透性具有非常显著性差异($P<0.001$, $n=6$)。

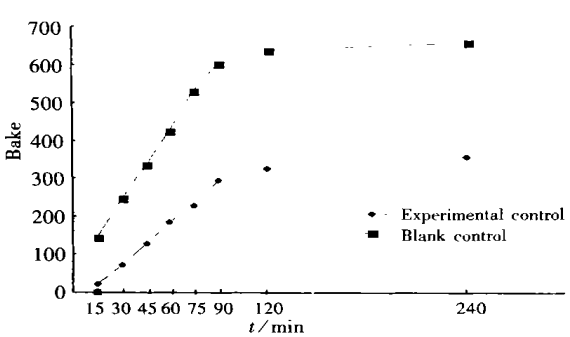


图 2　耳蜗内皮细胞对 RISA 的通透性曲线

Fig 2　Permeability curve of cochlear endothial cells on RISA

3　讨论

自 60 年代, 国外学者提出血迷路屏障的概念并被普遍接受以来, 国内外对其进行了大量研究, 发现血迷路屏障功能异常与某些内耳疾病的发生存在着一定的联系。但未能对其病理生理学意义进行探索, 更无法利用调控其通透性的方法防治这类内耳疾病。研究证实, 血迷路屏障同血脑屏障等其它屏障系统一样, 是以毛细血管内皮细胞及其联结为基础而构成的物质交换机制的集合, 因此, 研究血迷路屏障的关键是研究耳蜗微血管内皮细胞的通透性。

由于内耳结构复杂, 毛细血管量少, 所以取得耳蜗微血管内皮细胞有较大困难。作者成功培养了所需要的豚鼠耳蜗微血管内皮细胞[1], 本实验在此基础上将该内皮细胞跨细胞电阻的动态变化及峰值大小, 以及细胞单层对^{125}I-牛血清白蛋白的通透性进行了研究, 以了解其体外培养时的通透性特征。

国外学者在研究某些内皮细胞体外生物学特性时发现, 内皮细胞单层融合状态下的跨膜电阻值(Transendothelial monolayer electric resistance TEMER)是反映某一内皮细胞通透能力的灵敏指标, Helga[5] 等首次测出了脑微血管内皮细胞的 TEMER 为(285±5)Ω/cm^2(n=5), 并认为该值是所有内皮细胞中的最大值。我们借鉴了他们的研究思路, 摸索出了更简便的测量 TEMER 的方法, 率先观察了耳蜗内皮细胞培养时 TEER 的动态变化: 即细胞接种的早期, 随着细胞密度的增加, TEER 值缓慢升高, 细胞密集开始融合时, 该值迅速上升, 完全融合后 TEER 值到达最高, 即 TEMER, 为(118.9±18.5)Ω/cm^2(n=6 mean ±S.E.M), 该值持续 2~3 d 后又开始下降。首先这种数量上的变化反映了细胞的致密融合程度, 即细胞增殖时由稀疏到致密到稀疏的生长过程, 为进行通透性离体研究的时机提供了参考。同时我们发现, 耳蜗微血管内皮细胞的跨膜电阻值明显小于脑微血管内皮细胞, 它所反映的结果与该两种细胞所代表的屏障系统在体内时的通透能力完全一致。

在参照国外研究血脑屏障通透性体外模型技术方法的基础上[6], 作者采用小池技术, 将内皮细胞接种在经鼠尾胶原及粘连蛋白处理后的 Millicell 上, 使细胞顺利贴壁, 单层生长, 首次建立起了耳蜗微血管内皮细胞通透性的体外模型, 并将该模型对 RISA 通透性进行了研究, 结果表明, 其贝克-时间变化图呈先快后慢的抛物线型上升曲线, 90 min 内几乎呈直线, 经统计学处理后, 得到了最佳的二次曲线方程和直线方程, 这一通透性曲线既反映了体外耳蜗微血管内皮单层对中分子量物质牛血清白蛋白的通透特点, 同时亦与以往对

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

血脑屏障体外通透性模型的研究结果相似，说明本研究建立的耳蜗微血管内皮细胞通透性的体外模型，与国外学者普遍应用的血脑屏障的体外模型，有着十分相似的通透性特点[7]，能够用于血迷路屏障体外通透性研究。

参考文献：

[1] 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.
[2] William M，Pardriage，Domingo T，*et al*. Comprison of *in vitro* and *in vivo* models of drug transcytosis through the blood-brain barrier[J]. The Journal of pharmacology and Experimental therapeutis，1990，253(2)：884－889.
[3] Furie M B，Cramer E B，Naprstek B L，*et al*. Cultured endothelial cell monolayers that restrict the transendothelial passage of macromolecules and electrical current[J]. The Journal of Cell Biology，1984，98(3)：1033－1041.
[4] M A Deli，M P Dehouck，R Cecchelli，*et al*. Histamine induces selective albumin permeation through the blood brain barrier *in vitro*[J]. Inflamm Res Supplement，1995，44(1)：56－57.
[5] Helga E，Margret C M，Blom R，*et al*. Effect of endotoxin on permeability of bovine Cerebral endothelial cell layers *in vitro*[J]. J Pharmacology and Experimental Therapeutics，1996，277(3)：1418－1423.
[6] Dehouck M P，Meresse S，Delorme D，*et al*. An easier，Reproducible and mass production method to study the blood-brain barrier *in vitro*[J]. J Neurochem，1990，54(5)：1798－1801.
[7] Rubin L L，Hall D E，Porter S，*et al*. A cell culture model of the blood-brain barrier[J]. J Cell Biol，1991，115(6)：1725－1735.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)09-1058-01

烧冲复合伤早期复合高渗醋酸盐溶液复苏对酸碱平衡的影响

Effects of compound hypertonic sodium acetate solution on acid-base balance in the early stage of burn-blast combined injury

邱 俊，周继红，朱佩芳，刘大维，翁 奇，侯淦泉，翁格文 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室，重庆 400042）

本实验采用高渗醋酸盐复合促甲状腺素释放激素(TRH)溶液，对重度烧冲复合伤狗进行早期复苏，探讨其对酸碱平衡的影响。

1 材料与方法

健康本地雄性杂种狗 21 只，随机分为促甲状腺素释放激素治疗(TRH)组、高渗醋酸盐液治疗(HAD)组和复合高渗醋酸盐溶液治疗(HTC)组，每组 7 只。动物用凝固汽油致背部 25% Ⅲ度烧伤，用 BST-Ⅰ型生物激波管致中偏重度冲击伤。

于伤后 2 h，TRH 组、HAD 组、HTC 组动物分别在 5 min 内 1 次性静脉推注 2.5 mg/kg 1% TRH 盐液、4 ml/kg 1.127 mol/L 醋酸钠液和 4 ml/kg 复合高渗醋酸盐液，伤后 3 h 各组给予常规持续补液治疗。24 h 后放血活杀动物。

动态观察动物的呼吸频率(R)，于伤前、伤后 2、3、8 h 和 24 h 抽血观察动脉血气和酸碱平衡指标的变化。

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，各时相点及组间比较采用 Student's t 检验统计分析。

2 结果

伤前动物呼吸频率为(27±9)次/min，伤后各组动物的呼吸频率均增快，伤后 2 h 为伤前的 141%～170%($P>0.05$)；给与一次性补液后，呼吸频率进一步加快，达伤前的 163%～174%($P<0.01$)，TRH 组于一次性补液后 30 min、HAD 和 HTC 组于一次性补液后 15 min 达峰值，分别为 47±6 次/min、47±8 次/min 和 48±9 次/min；在伤后 3 h 短暂的回落后，呼吸频率再度加快，出现第二个峰，HAD 组和 TRH 组在 6 h、HTC 组在 8 h 后呼吸频率逐渐回落，12 h 后逐渐接近伤前水平($P>0.05$)。在治疗过程中 HTC 组呼吸频率较其它两组更快，且持续时间更长，但无统计学意义。

动物伤前动脉血 pH 值为 7.37±0.08，一次性补液后有所升高，2～3 h 达峰值(TRH 组 7.39±0.05、HAD 组 7.48±0.12、HTC 组 7.46±0.02)，其中 HTC 组明显高于伤前和 TRH 组($P<0.01$)，随后逐渐回落。PaO_2 在一次性补液后有所升高，随后逐渐回落，其变化始终在正常范围内。伤前 $PaCO_2$ 为(5.12±0.58)kPa，伤后有所下降，伤后 2 h 达(4.22±0.59)kPa($P<0.01$)，HAD 组和 HTC 组补液后回升至伤前水平；TRH 组一次性补液后进一步下降，伤后 3 h 最低(3.79±0.47)kPa($P<0.01$)，随后缓慢回升。动脉血 BE-B 伤前为(0.07±1.08)mmol/L，伤后明显下降，伤后 2 h 达(－3.12±2.65)mmol/L($P<0.05$)，给 TRH 后继续下降，3 h 达最低值(－4.7±2.49)mmol/L($P<0.05$)，HAD 组和 HTC 组给药后回升，伤后 3h 达最高值，分别为(5.63±2.04)mmol/L 和(3.42±4.75)mmol/L($P<0.05$)，其中 HTC 组的值明显低于 HAD 组($P<0.01$)、明显高

（下转 1063 页）

基金项目：全军“九五”指令性攻关项目(96L040)
作者简介：邱 俊(1973－)，男，重庆市垫江县人，主要从事野战外科方面的研究。电话：(023)68757464
收稿日期：2001-07-12；修回日期：2001-10-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net