DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.018
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
418 2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)04-0418-03

豚鼠内耳微血管内皮细胞的跨细胞电阻

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 研究豚鼠内耳微血管内皮细胞跨细胞电阻的动态变化及峰值大小。方法 ① 胶原酶消化法分离培养豚鼠内耳及脑微血管内皮细胞,免疫组化法进行鉴定;②建立起内皮细胞通透性的体外模型,研究该模型下内耳内皮细胞的跨细胞电阻,并与脑及肺内皮细胞进行比较。结果 ①培养细胞致密融合时具有内皮细胞培养时典型的"铺路石样"外观,与肺内皮细胞株的形态一致,经免疫组化检测其内皮细胞标志性抗原Ⅷ因子,95%以上的培养细胞的胞浆中呈棕黄色阳性反应;②三种内皮细胞在培养增殖过程中其跨细胞电阻值呈动态变化过程,以$5\times10^4/cm^2$的细胞密度接种时,7 d左右电阻到达峰值,内耳、脑及肺三种内皮细胞的跨细胞电阻峰值大小分别为(118.9±18.5)Ω/cm^2,(244.7±46.9)Ω/cm^2,(46.6±5.9)Ω/cm^2($n=6$),三者相差非常显著($P<0.001$)。结论 内耳微血管内皮细胞跨细胞电阻峰值小于脑内皮而大于肺内皮细胞,证明了三者通透性的差别。

关键词:豚鼠;内耳;微血管;内皮细胞;通透性;跨内皮细胞电阻
中图法分类号:R322.923;R339.16 文献标识码:A

Transendothelial electrical resistance of microvascular endothelial cells from inner ear of 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 dynamic changes and the peak of transendothelial electrical resistance (TEER) of inner ear microvascular endothelial cells (EMEC) of guinea pigs. Methods ① EMEC and brain microvascular endothelial cells (BMEC) were isolated from guinea pigs and cultured with collagenase digestion. The cells were identified with immunohistochemical methods; ② After the establishment of the model for determining the permeability of endothelial cells *in vitro*, the TEER of EMEC was measured on it, and the results were compared with those of BMEC and lung microvascular endothelial cells (LMEC). Results ①Consistent with the features of LMEC, the monolayer confluent cells we cultured showed typical "flagstone" appearance as cultured endothelial cells. Immunohistochemical detection of factor VIII, a mark antigen of endothelial cells, verified that over 95% of cultivated cells were positive to the factor with cytoplasmic buffy staining ② The TEERs of the 3 endothelial cells changed dynamically and reached the peak about 7 d after the cultured cells were inoculated at a $5\times10^4/cm^2$ dosage. The TEER's peak values of EMEC, BMEC and LMEC were 118.9±18.5, 244.7±46.9, and 46.6±5.9Ω/cm^2 respectively ($n=6$). Very significant differences were seen among the 3 peaks ($P<0.001$). Conclusion The TEER peak of EMEC is lower than that of BMEC but greater than that of LMEC, which indicating the difference on their permeability.

Key words: transendothelial electrical resistance; endothelial cell; microvascule; permeability; inner ear; guinea pig

机体的中枢器官由于其功能的重要性,稳定的内环境对其具有更加特别的意义。血迷路屏障是中枢器官的生理屏障系统之一,在维持内耳微环境稳定方面起到了十分重要的作用,内耳微血管内皮细胞是构成这两个屏障的组织学基础[1]。本研究在分离培养豚鼠内耳微血管内皮细胞的基础上,建立起内皮细胞通透性的体外模型,研究了该体外模型下内耳跨细胞电阻的动态变化,并将其峰值大小与大脑及肺微血管内皮细胞进行了对照,为在体外研究血迷路屏障的通透性调控,开辟了新的途径。

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0.4 μm,由Millipore公司生产,使用前滤膜上分别涂以醋酸鼠尾胶原和粘连蛋白(Roche)液。

1.1.3 兔肺微血管内皮细胞株购于APCC公司。

1.2 方法

1.2.1 豚鼠耳蜗微血管内皮细胞的分离培养及鉴定[2] 选取200 g左右的正常杂色豚鼠10只,麻醉,断头,取出听泡,无菌条件下解剖显微镜下完整剥离出耳蜗外侧壁软组织,分离出含深色色素的血管纹,将其切碎置培养皿中,加入0.1%Ⅱ型胶原酶工作液,充分吹打后放入37 ℃恒温箱中振荡消化1 h,去除未消化掉的组织残块,消化液离心(1000× g 离心10 min),所得沉淀加入含25%胎牛血清的DMEM(hyclone)培养液,并接种于直径35 mm的培养皿中,置5% CO_2,37 ℃培养箱中培养。2~7 d内,可观察到培养皿底有多个细胞数量不等的细胞岛形成,每3 d更换1/2的培养液,同时每日在倒置显微镜下刮去散在的可疑杂细胞,15~30 d后,当细胞已接近长满培养皿底时,消化接种传代。

1.2.2 豚鼠脑组织微血管内皮细胞的分离及纯化 参照Dorovini等[3]的方法,无菌条件下,取2~4只豚鼠的脑组织,去掉小脑、软脑膜及白质部分,将脑灰质剪碎成大小1 mm^3左右的小块,置玻璃匀浆器中,在300 r/min左右的转速下,上下匀浆20次,组织匀浆依次通过138 μm和78 μm的尼龙网。将78 μm尼龙网上的组织洗涤入培养皿中,显微镜下收集微血管段,并放入加有0.1%Ⅱ型胶原酶工作液的35 mm培养皿中,37 ℃下振荡消化

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方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752579
收稿日期:2002-01-31;修回日期:2002-03-14

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

20 min, 尔后同上法培养及纯化, 得到脑微血管内皮细胞。

1.2.3　内皮细胞的鉴定　　培养皿底放入盖玻片并固定, 将纯化的培养细胞接种其中, 待细胞到达合适密度后, 4% 多聚甲醛固定, 依次滴加过氧化物酶阻断液(3% H_2O_2, 甲醇配制), 正常山羊血清, 1∶100 兔抗人Ⅷ因子多克隆抗体(一抗), 生物素标记的 1∶100 二抗工作液(通用型 IgG/Bio), 辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 1∶100 工作液, 然后用 DAB 显色液显色, 封片观察。同时用豚鼠肝细胞作阴性对照, 用平衡盐溶液代替Ⅷ因子抗体作空白性对照, 其余步骤不变。

1.2.4　微血管内皮细胞通透性体外模型的构建　　该模型由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, 向内池中接种入内皮细胞悬液(细胞密度 $5\times10^4/cm^2$), 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 d 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[4], 待用。

1.2.5　体外模型的跨细胞电阻　　参照 Helga 等[5] 检测脑血管内皮细胞单层电阻的方法加以改进, 两片电极分别置于滤膜表面及滤膜下, Millicell 中各注入 2.8 ml 含胎牛血清的 DMEM 培养液, 用 Tenica 多用电表测量每只 Millicell 的基础电阻值, 尔后将 EMEC 消化、离心、细胞计数, 按 $5\times10^4/cm^2$ 的密度接种于 Millicell 中, 分别在 2、4、6、7.8、9、10、12、14 d 测量其电阻值, 减去各自的基础电阻后除以 Millicell 的底面积, 即获得了其跨细胞电阻值(单位: Ω/cm^2)。同时用 BMEC 作阳性对照, 用 LMEC 作阴性对照, 样本数均为 6。

1.2.6　统计学处理　　采用 SSPS10.0 统计软件, 进行两样本均数比较的统计学处理。

2　结果

2.1　内皮细胞的培养及鉴定

耳蜗血管纹组织块经胶原酶消化 20 min 后, 上清液中即悬浮有少数圆球形的细胞, 1 h 后, 这些圆球形细胞明显增加, 并汇集成多个细胞团。原代培养后 24~72 h, 培养皿底可见由几个至十几个细胞形成的由多边形细胞组成的细胞岛已贴壁伸展开, 同时其间有散在的杂细胞, 见图 1。这些细胞经搔刮纯化后, 细胞形态与肺内皮细胞株基本一致。培养细胞纯化后, 以多边形为主, 7~8 h 形成致密融合的单层, 呈现出内皮细胞培养时典型的"铺路石样"外观, 见图 2。经免疫组化法检测其标志性抗原Ⅷ因子, 95% 以上的培养细胞胞浆内有棕黄色着色, 呈阳性反应, 见图 3, 对照组则无此着色。

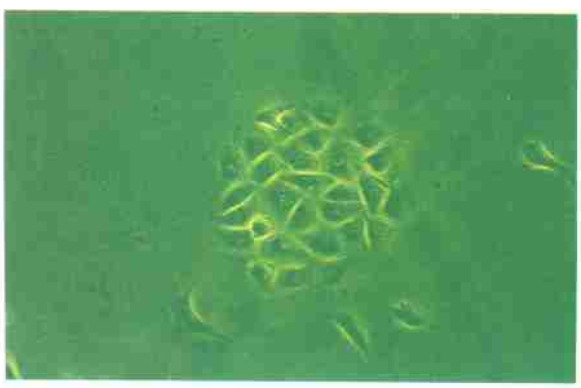


图 1　耳蜗血管纹经胶原酶消化后 48 h 由多边形细胞形成的细胞岛　(×300)

Fig 1　Formation of cell islands from ploygon cells in cochlear striae 48 h after collagenase digestion　(×300)

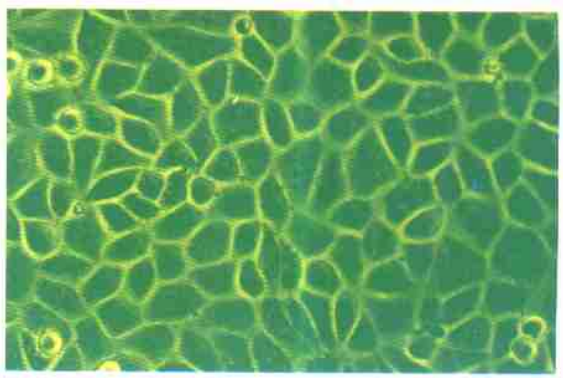


图 2　细胞接种后 8 d 单层内皮细胞呈"铺路石样"外观　(×500)

Fig 2　"Flagstone" appearance of monolayer endothelial cell 8 d after inoculation　(×500)

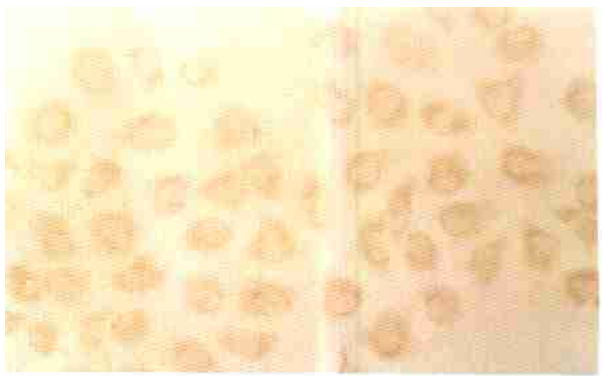


图 3　纯化后培养细胞, 经免疫组化 SP 法检测Ⅷ因子抗原, 胞质呈棕黄色阳性反应　(S-P×300)

Fig 3　Yellow cytoplasm of the cultured cells in the immunochemial method for factor Ⅷ　(S-P×300)

脑灰质组织经匀浆过滤后, 其 78 μm 尼龙网的洗涤液中光镜下可搜集到细小的微血管段, 它们经胶原酶消化接种后, 培养皿底可见与上述相似的细胞岛。经纯化后, 培养细胞的形态与上述有相似的外观, 经Ⅷ因子检测, 阳性反应细胞达到 90%。

2.2　内耳、脑及肺内皮细胞的跨细胞电阻

2.2.1　内耳、脑及肺内皮细胞的跨细胞电阻动态变化值

表 1　内耳、脑及肺内皮细胞的跨细胞电阻均数动态变化

Tab 1　Dynamic changes of mean TEER values of EMEC, BMEC and LMEC

Time(d)	Electric resistance(Ω/cm^2)		
	EMEC group	BMEC group	LMEC group
2	11.2	9.9	8.0
4	25.0	46.4	18.9
6	78.4	102.9	28.2
7	118.9	181.2	40.8
8	113.2	244.7	46.6
9	115.2	144.2	44.8
10	104.8	201.0	43.7
12	74.9	128.5	28.5
14	48.1	91.6	18.5

2.2.2　耳蜗、脑及肺内皮细胞跨膜电阻(TEER)动态变化, 见图 4。

耳内皮细胞(EMEC)、脑内皮细胞(BMEC)、肺内皮细胞(LMEC)的TEER 峰值分别为 118.9±18.5, 244.2±38.3, 46.6±5.9, 经方差分析, 各组间相差非常显著($P<0.001$)。

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

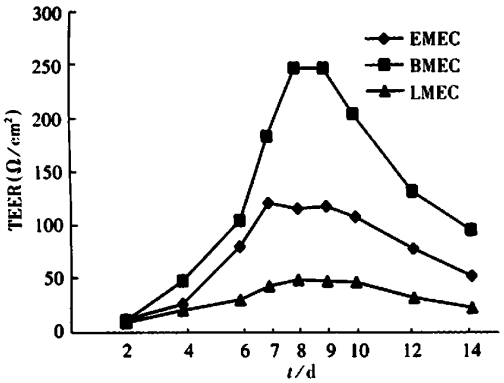


图 4 耳蜗、脑及肺内皮细胞 TEER 随时间变化图

Fig 4 TEER of EMEC, BMEC and LMEC with time elapsing

3 讨论

血脑屏障是机体内最重要的生理屏障系统，它是维持中枢神经系统内环境稳定的基础。一些学者在对比研究血脑屏障及血内耳迷路对几种不同物质的通透性时发现，迷路对这些物质存在着选择性的通透，与血脑屏障有一定的相似性，因此，他们认为内耳中存在着一种功能类似于血脑屏障的物质交换机制，故将其称为血迷路屏障。此后，许多学者先后开展了内耳解剖、组织、生理学研究，证实了血迷路屏障的存在，并初步总结出该屏障与血脑屏障一样，都是由毛细血管内皮细胞为基础而构成的物质交换系统[1]。

Auerbach 等[6] 通过研究证实，不同血管内皮细胞其细胞生物学特性存在着较大的差异，例如与肺等外周器官的内皮细胞相比，中枢器官的微血管多为无窗型内皮，细胞间形成紧密连接，胞饮较少，对辣根过氧化物酶等大分子物质不通透，因此，有学者将这类微血管内皮称为屏障型内皮细胞。构成血脑屏障和血迷路屏障的脑及内耳微血管内皮细胞是典型的屏障型内皮，但这两种内皮细胞也有着不同的通透特性。近年来由于脑微血管内皮的分离培离成功，使血脑屏障的通透性研究及药理学研究向前迈出了一大步，但迄今国内外尚未见内耳微血管内皮细胞体外通透性的研究报告。

作者曾采用微小组织块贴壁培养法，首次成功分离培养了豚鼠耳蜗微血管内皮细胞内皮细胞[7,8]。本研究改用胶原酶消化法培养该细胞，不仅大大提高了单次培养成功率，而且纯化步骤更简单，经免疫组化法鉴定，95%以上的细胞胞浆中含有内皮细胞的标志性抗原Ⅷ因子，表明该方法培养的细胞是符合实验要求的基本纯净的豚鼠耳蜗微血管内皮细胞，能够用于其体外通透性的研究。

国外学者已经证实，机体内血脑屏障是一个离子电荷屏障，在离体条件下通过检测内皮细胞单层融合状态下的跨内皮电阻(Transendothelial monolayer electric resistance TEMER)，能够反映出这一屏障的某些生理学特征[9]。Michael 等[9] 将脑微血管内皮与其它内皮细胞的 TEMER 进行了比较研究后提出，该值的大小反映了各种内皮细胞屏障能力的不同，因而是评估内皮细胞通透能力的灵敏指标。Helga 等[5] 测出了滤膜培养的脑微血管内皮的 TEMER 值为 $(285\pm5)\Omega/cm^2$，且经地塞米松处理后电阻值可上升到 $(375\pm21)\Omega/cm^2$，而应用脂多糖后该值下降为 $(140\pm9)\Omega/cm^2$，与这两种物质调节体内血脑屏障通透性的效应一致。Martha 等[10] 将脑微血管内皮细胞接种在羊膜上，测得 TEMER 值为 $(69\pm28)\Omega/cm^2$，最大值 $127\Omega/cm^2$，说明某一种内皮生长在不同的依托材料下，由于内皮细胞间连接致密程度的差别，其 TEMER 值有较大的不同。

本研究借鉴了上述研究思路，经改良摸索出更简便的测量 TEER 的方法，以此观察了滤膜培养的豚鼠内耳内皮细胞电阻值的动态变化，并与脑及肺微血管内皮细胞进行了对照，结果显示：三种内皮细胞接种的早期，随着细胞密度的增加，TEER 值均缓慢升高，细胞密集开始融合时，该值迅速上升，完全融合后电阻值到达最高，即 TEER＝TEMER，持续 2～3 d 后又开始下降，其 TEER 数量上的变化反映了细胞的生长状态，为进行通透性离体研究的时机提供了参考。另外，耳蜗组的 TEMER 值，明显小于脑内皮细胞，又大大高于肺内皮细胞组(均 $P<0.001$)，与以往学者在活体动物上的研究结论一致，这一结果进一步证实，内皮细胞的 TEMER 值大小，反映其在体内外的通透能力，从而为将来开展血迷路屏障的体外通透性及调控研究，开辟了新的途径。

参考文献：

[1] Juhn S K, Rybak L P, Prado S. Nature of blood-labyrinth barrier in experimental condition[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1981, 90(2Pt1): 135－141.

[2] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版公司西安公司，1996. 63－83.

[3] Dorovini Z K, Prameya R, Bloowman P D. Culture and characterization of microvessel endothelial cells derived from human brain[J]. Lab Invest, 1991, 64: 625－436.

[4] William M, Pardriage, Domingo T, *et al*. Comprison of *in vitro* and *in vivo* models of drug transcytosis through the blood-brain barrier[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1990, 253(2): 884－889.

[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 Pharmacol Exp Ther, 1996, 277(3): 1 418－1 423.

[6] Auerbach R, Alby L, Morrissey L W, *et al*. Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells[J]. Microvasc Res, 1985, 29(3): 401－441.

[7] 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.

[8] Michael J, Rutten, Richard L, *et al*. Electrical resistance and macromolecular permeability of brainendothelialmonolayercultures[J]. Brain Res, 1987, 425(3): 301－310.

[9] 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): 4 091－4 411.

[10] Martha B, Furie, Eve B, *et al*. Cultured endothelial cell monolayers that restrict the transendothelial passage of macromolecules and electrical current[J]. J Cell Biol, 1984, 98: 1 033－1 041.

(编辑 陈聪连)

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