

星形胶质细胞可以诱导内皮细胞系紧密连接的形成*

陈祎招^{***,****} 徐如祥^{**} 徐宗俊^{***} 杨志林^{**} 姜晓丹^{**}
 (第一军医大学珠江医院神经外科^{**} 检验科^{***} 广州 510282)

摘要 为探索星形胶质细胞在血脑屏障内皮细胞紧密连接形成中的重要意义,通过内皮细胞系 ECV304 与星形胶质细胞体外接触共培养的方法,采用电镜及内皮细胞紧密连接的银染观察星形胶质细胞对内皮细胞系紧密连接的诱导作用。运用 Millipore-ERS 系统检测紧密连接的功能状况。结果发现,星形胶质细胞可以诱导内皮细胞系形成广泛而连续的紧密连接并产生较高的跨内皮阻抗(transendothelial electrical resistance, TER),于第 10d 可达 $321.3\Omega\text{cm}^2$ 。提示,星形胶质细胞可以诱导 ECV304 细胞产生紧密连接。同时,ECV304 细胞与星形胶质细胞的体外共培养可以作为研究血脑屏障紧密连接结构与功能的一种可靠而简便的体外实验方法。

关键词: 胶质细胞 内皮细胞 血脑屏障 紧密连接

血脑屏障是中枢神经系统的重要结构,虽然它的发现至今已有一百多年的历史,但是维系此重要结构的细胞生物学与分子生物学机制仍不十分清楚。本文通过星形胶质细胞与内皮细胞系的共培养研究,探讨了胶质细胞对内皮细胞血脑屏障紧密连接的诱导作用,为今后深入研究血脑屏障结构与功能的分子机制奠定了基础。

形胶质细胞。实验全部采用 2-3 代胶质细胞。ECV304 人脐静脉内皮细胞系由 ECACC 提供,培养条件同星形胶质细胞。

材料与方 法

1. 主要试剂与仪器

DMEM 高糖培养基为 GIBCO 产品;细胞共培养用 $1\mu\text{m}$ 6 孔板 Cell Culture Inserts 为 FALCON 产品。跨内皮阻抗测试用 Millicell-ERS 系统购自 MILLIPORE 公司。兔抗 GFAP 多克隆抗体及免疫组化 SABC 试剂盒为博士德公司产品。

2. 星形胶质细胞的体外培养与细胞系

参照 McCarthy^[1]方法,取新生 1-2d 的 SD 大鼠,无菌条件下取出大脑,置入 D-Hank's 液中,在解剖显微镜下剔除脑膜及血管组织,分离大脑皮层,剪碎后在 0.125% 的胰蛋白酶中 37°C 消化 15 分钟,用含有血清的培养基终止消化吹打使细胞分散后,1000 r/min 离心 10min,弃上清并加入高糖 DMEM 完全培养基,接种入培养瓶贴壁 4h 处理以除去成纤维细胞。然后以 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的密度接种于塑料培养瓶中,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养,生长 8-10d 待细胞汇合后,置于 37°C 摇床中,250 r/min,14-16h,收集经摇床震荡后的贴壁细胞,加新鲜培养液培养,即可得纯度较高的星

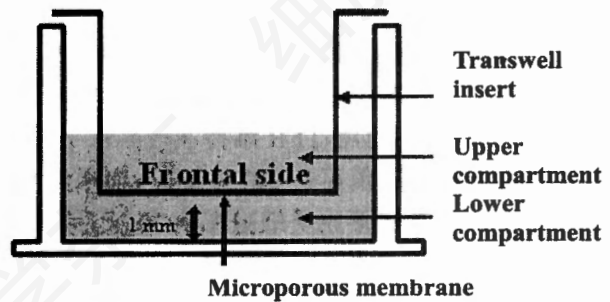


图 1 细胞共培养示意图

3. 内皮细胞系/胶质细胞接触共培养

先将 10^6 纯化的星形胶质细胞接种于 Inserts 中微孔膜的反面,待胶质细胞长至约 80% 汇合后,将 1×10^5 ECV304 细胞接种于微孔膜正面,使其通过微孔形成接触式共培养(参见图 1)。接种后 3-4d,ECV304 细胞完全汇合,此后每天换液 1 次。

4. 跨内皮阻抗 (Transendothelial electrical resistance, TER) 的检测

本文 2003 年 4 月 28 日收到,7 月 11 日接受。

*基金项目:国家自然科学基金(3017961)、军队十五重点项目基金(01ZD54)。

**** 联系人。E-mail: chenyzhao@21cn.com

将长有 ECV304 及胶质细胞系的 Inserts 置于室温的新鲜完全 DMEM 培养基中,采用 Millicell-ERS 系统检测其 TER。测得阻抗值减去无细胞生长 Inserts 中膜的背景阻抗值即为 TER。TER 基于膜面积以 Ωcm^2 表示。

5. 细胞形态学及电镜观察

ECV304 细胞完全汇合后,分别在低倍与高倍相差显微镜下观察。长有 ECV304 与胶质细胞的微孔膜经 2.5% 的戊二醛固定后按透射电镜常规操作程序进行观察。

6. 内皮细胞间紧密连接的银染

按 Raub^[2]的方法,汇合的内皮细胞单层用 PBS 洗后于固定液(1%多聚甲醛,0.5%戊二醛,75mmol/L 二钾磷酸钠, pH 7.4)中固定 3min,然后依次用 0.9% NaCl 灌注 2min, 5%葡萄糖 10s,0.2%硝酸银 7s,5%葡萄糖 10s,再以固定液固定 1min 后置于强光下 15min。

7. 统计学分析

多组 TER 统计分析采用方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。两组酶活性的比较采用两样本均数的 *t* 检验。

结 果

1. 星形胶质细胞的分离纯化

GFAP 免疫组化结果显示,99% 以上的分离细胞均为 GFAP 阳性(见图版图 1)。

2. 星形胶质细胞对内皮细胞系跨内皮阻抗的影响

图 2 显示,与星形胶质细胞共培养的 ECV304 细胞可形成较高的跨内皮阻抗,尤其以接种第 6 天以后更为明显,此后可将 TER 维持在较高水平,其第 10 天形成的 TER 值可达 $321.3\Omega\text{cm}^2$;而单纯培养 ECV304 细胞与星形胶质细胞在第 10 天形成的 TER 值分别为 150.9 及 $118.0\Omega\text{cm}^2$ 。从第 7 天始,ECV304/胶质细胞共培养组与上述单纯培养组差别有统计学意义($n=10, P<0.05$, 方差分析, LSD 法);ECV304 单纯培养组与星形胶质细胞单纯培养组间差别不显著($n=10, P>0.05$, 方差分析, LSD 法)。

3. 内皮细胞系与星形胶质细胞共培养后的超微结构

图版图 2 与图版图 3A 示共培养 10d 后的 ECV304 彼此间细胞膜接触形成紧密连接,细胞内可见大量的线粒体,而吞饮泡含量较少。同时,在共培养过程中星形胶质细胞可以形成终足(end-feet)通过微孔与内皮细胞相联系,未见内皮细胞窗口。未与星形胶质细胞共培养的 ECV304 细胞间没有紧密连接的形成(图版图 3B)。

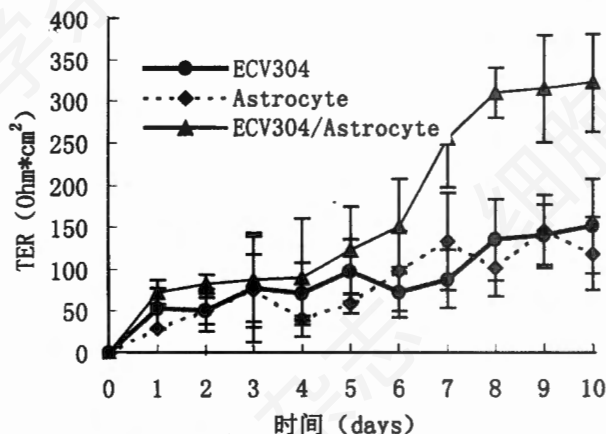


图 2 星形胶质细胞对 ECV304 内皮细胞系 TER 的影响

4. 星形胶质细胞对 ECV304 内皮细胞系紧密连接的诱导

星形胶质细胞可以诱导 ECV304 内皮细胞系形成明显的紧密连接。图版图 4A 示共培养 10d 的 ECV304 细胞,可见彼此相邻的 ECV304 细胞膜基本汇合,形成光滑、连续、长而密度很高的紧密连接;图版图 4B 示单纯培养 10d 的 ECV304 细胞间未见明显较长的紧密连接。

讨 论

血脑屏障是中枢神经系统的重要结构,它保证了中枢神经系统所需内环境的高度稳定,是中枢神经系统正常进行各项机能活动的基础;同时,血脑屏障结构和/或功能的变化也是许多疾病病理生理变化的核心过程^[3]。一般认为,血脑屏障主要由血管内皮细胞、基膜、胶质细胞组成,其中,血管内皮细胞及其间的紧密连接是血脑屏障机能与结构的主要基础^[4,5]。然而,是什么因素诱导内皮细胞间形成紧密连接进而表现出血脑屏障的结构与功能特点呢?这方面目前仍不十分清楚。为了探索这一问题,Janzer 等率先将大鼠胶质细胞移植入鸡绒毛膜及大鼠眼前房中,发现胶质细胞可以诱导移植部位的血管出现与血脑屏障类似的“屏障”特性从而推断胶质细胞可以诱导血管内皮细胞出现血脑屏障的结构与功能特点^[6]。但是,Holash 等在反复重复 Janzer 等的实验中发现,移植过程中机体可以产生一些复杂炎症反应严重干扰了实验结果。因此,目前很多学者认为,有关胶质细胞诱导内皮细胞表现血脑屏障结构与功能的作用方面目前得出结论仍为时尚早^[7,8]。为了进一步探索星形胶质细胞与血脑屏障

形成的关系并避免体内复杂因素的干扰,我们采用了体外三维共培养系统来研究星形胶质细胞对内皮细胞间紧密连接的影响。在这一体外过程中,星形胶质细胞可以通过微孔膜中直径约 $1\mu\text{m}$ 的微孔与内皮细胞系建立终足联系并进行相互作用。我们的结果表明,星形胶质细胞可以诱导内皮细胞系细胞间形成广泛的紧密连接并具有与体内血脑屏障相似的功能特点。同时,在星形胶质细胞的作用下,内皮细胞还表现出其他与体内血脑屏障相似的超微结构特点,如:细胞内线粒体含量较多、细胞无窗口形成及较少吞饮泡等。

在血脑屏障紧密连接的功能检测方面,我们采用检测 TER 的方法来反映细胞间紧密连接的功能状态。与传统采用各种检测示踪剂(如,蔗糖、白蛋白、过氧化物酶等)的方法相比,TER 的测量更加敏感而简便并能进行适时监测。在检测原理上,它的主要优势在于能适时检测内皮细胞单层对电流(离子流)的阻抗并消除膜电容影响从而有效地反映紧密连接的“屏障”功能^[9,10]。我们的研究表明,ECV304 在星形胶质细胞的作用下,细胞间可以形成广泛的紧密连接复合体进而抑制了外加电场下电流(离子流)的跨内皮运动,从而产生高达 $321.3\Omega\text{cm}^2$ 的 TER 值。这一结果提示,在胶质细胞作用下,内皮细胞系间紧密连接也可以表现出与体内血脑屏障相似的功能特点。

然而,星形胶质细胞是如何诱导内皮细胞间形

成紧密连接并具有血脑屏障特点的呢?这一过程的物质基础和分子原理是什么?目前还不十分清楚。随着分子生物学的发展,星形胶质细胞与内皮细胞的相互作用在血脑屏障形成过程中的重要作用越来越受到广大研究者的重视^[11-13]。揭示这一过程无疑将会推动神经科学的发展并大大提高我们的临床诊治水平。我们期待通过进一步的实验研究为科研与临床工作者提供一些启示。

参 考 文 献

- [1] McCarthy, KD. et al., 1980, *J. Cell Biol.*, **85**(3): 890-902.
- [2] Raub, TJ., 1996, *Am J Physiol.*, **271**(2 Pt 1): C495-503.
- [3] Lechardeur, D. et al., 1995, *Exp Cell Res.*, **220**(1): 161-170.
- [4] 张培林, 1995, 神经解剖学, 张培林主编, pp. 506-510, 人民卫生出版社, 北京.
- [5] Ferenc, JOO. et al., 1996, *Progress in Neurobiology*, **48**(3): 255-273.
- [6] Janzer, RC. et al., 1987, *Nature*, **325**(6101): 253-257.
- [7] Holash, JA. et al., 1993, *Dev Dyn.*, **197**(1): 14-25.
- [8] Rubin, LL. et al., 1999, *Annu Rev Neurosci.*, **22**: 11-28.
- [9] Prudence, A. et al., 1993, *J. Cell Sci.*, **105**(Pt 2): 269-273.
- [10] Schneeberger, EE. et al., 1992, *Am J Physiol.*, **262**(6 Pt 1): L647-661.
- [11] Abbot, NJ. et al., 2003, *J. Neurochem.*, **85**(Suppl 2): 2.
- [12] Prat, A. et al., 2001, *Glia.*, **36**(2): 145-155.
- [13] Tan, KH. et al., 2001, *Neuroreport.*, **12**(7): 1329-1334.

THE INDUCTION OF TIGHT JUNCTIONS BETWEEN IMMORTALIZED ENDOTHELIAL CELLS BY ASTROCYTES*

CHEN Yi Zhao**·**** XU Ru Xiang** XU Zhong Jun***, et al.

(** Department of Neurosurgery, ***Department of Clinical Biochemistry, Zhujiang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510282 China)

ABSTRACT To investigate the effects of astrocytes and the formation of tight junctions of endothelial cells in blood-brain barrier. Immortalized endothelial cell line ECV304 was cocultured with astrocytes. The presence of tight junctions between endothelial cells was investigated by electrical microscope following silver staining. Transendothelial electrical resistance (TER) of monolayer of ECV304 was measured by Millipore-ERS system to determine the function of tight junctions. Astrocytes could induce tight junctions between endothelial cells. The TER value was increased to $321.3\Omega\text{cm}^2$ after being cocultured with astrocytes. Astrocytes can induce the formation of tight junctions between endothelial cells. At the same time, this coculture method of ECV304 and astrocytes can be a useful model to investigate the molecular mechanism of the formation of tight junctions in blood-brain barrier.

Key words: Astrocyte Endothelial cell Blood-brain barrier Tight junction

* Supported by National Natural Science Foundation of China(3017961) and the Key Project Foundation of the "Tenth Five-Year Plan" of PLA(01ZD54).

**** Corresponding author. E-mail: chenyzhao@21cn.com