

冰片对血脑屏障体外模型细胞间紧密连接和细胞吞饮囊泡的影响

陈艳明 王宁生[△]

摘要 目的 探讨冰片开放血脑屏障的机制。方法 制备含冰片的家兔血清,应用马丁达比狗肾上皮细胞系作为血脑屏障的体外模型,观察冰片对血脑屏障细胞间紧密连接、细胞吞饮囊泡的影响。结果 冰片能使血脑屏障体外模型细胞间紧密连接结构减少、细胞吞饮囊泡数量增加、粒径增大,冰片血清处理 4h 后先打开细胞间紧密连接,处理 24h 后才对细胞吞饮造成影响,移除冰片血清 24h 后上述影响即消失,说明上述作用具有可逆性。结论 冰片能明显使血脑屏障细胞间紧密连接松散,使物质经细胞间通道转运加速,冰片能明显使血脑屏障细胞吞饮小泡数量增多、体积增大,从而使经细胞吞饮的物质转运加速。

关键词 冰片;血脑屏障体外模型;马丁达比狗肾上皮细胞;细胞间紧密连接;细胞吞饮囊泡

Effect of Borneol on the Intercellular Tight Junction and Pinocytosis Vesicles in vitro Blood-Brain Barrier Model CHEN Yan-ming, WANG Ning-sheng *Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou TCM University, Guangzhou (510405)*

Objective To explore the mechanism of borneol in opening the blood-brain barrier (BBB). **Methods** Borneol contained serum was prepared and using Martin-Darby canine kidney epithelium (MDCK) cell line as the in vitro BBB model to observe the effects of borneol on intercellular tight junction (ICTJ) and pinocytosis vesicles of BBB model. **Results** Borneol reduced the ICTJ and caused increase of the number and enlarged the diameter of vesicles. The ICTJ was opened firstly 4 hrs after borneol treatment, then the pinocytosis was affected 24 hrs later. The effects disappeared 24 hrs after removal of the borneol contained serum, indicating that the above-mentioned effects were reversible. **Conclusion** Borneol could obviously loosen the ICTJ in BBB, accelerate the transportation of substance through the intercellular passage, it also could increase the number and volume of pinocytosis vesicles in BBB cells, thus to accelerate the transportation of substance by way of cell pinocytosis.

Key words borneol; in vitro blood-brain barrier model; Martin-Darby canine kidney epithelial cells; intercellular tight junction; pinocytosis vesicle

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)是存在于脊椎动物的血液循环与神经系统之间一层细胞屏障,起到保护中枢神经系统、维持脑内外环境稳定的作用。本实验从 BBB 的体外模型入手,模拟脑内环境,评价其代替 BBB 的可靠性,然后考察含冰片血清对于 BBB 模型的影响,体外模型与体内实验相互对照,以探讨冰片开放 BBB 的机制。

材料与方法

1 材料

基金项目 广东省自然科学基金资助项目(No. 98064)

作者单位 广州中医药大学临床药理研究所(广州 510405)

通讯作者 陈艳明, Tel: 020-36585532; E-mail: mileschen6@163.

com;

[△]为导师 万方数据

1.1 试剂和细胞系 DMEM, Hyclone 公司产品,批号:AMJ11206L;新生小牛血清,Life Technologies 公司产品,批号:1067635;二甲砷酸钠, NACALAI TESQUE INC 产品,批号:M4P9256;戊二醛, NACALAI TESQUE INC 产品,批号:MOF9275;冰片(合成) OsO_4 等其它试剂如未注明则均为分析纯;马丁达比狗肾(Martin Derby Canine Kidney, MDCK)上皮细胞系购于中国预防医学科学院。

1.2 仪器 透射电镜,日本 JEOL 公司产品,型号 JEM-1200EX;C 培养箱, Sanyo 公司产品;纯水机, Mili-Qplus, 柱子为 Milipore 公司产品,批号:FLSN29754;13mm×13mm 盖玻片。

1.3 冰片及其含药血清的制备 健康雄性新西兰家兔,体重 2.8kg 左右(购于广州中医药大学动物中心)灌服冰片 10g/kg,每天 1 次,连续 4 天,于末次给

药后 1h 取血,静置离心,上清液过 $0.22\mu\text{m}$ 的微孔滤膜即得冰片血清。用气相色谱法测得冰片的浓度为 $133.33\mu\text{g/ml}$ 。空白血清用同样方法取于同一受试兔给药前的血清。

2 方法 复苏后的 MDCK 上皮细胞,于完全 DMEM 培养液(含 10% 新生牛血清,青霉素 100U/ml 和链霉素 100mg),在 5% CO_2 培养箱,37℃ 条件下培养 3~4 天传代 1 次,隔天换液,传 3 代后用于实验。MDCK 细胞接种于 $13\text{mm} \times 13\text{mm}$ 的盖玻片上,盖玻片置于 6 孔培养板中并经完全 DMEM 培养液预处理(15min),接种密度为 5×10^5 个/ml,每孔 1ml;接种 24h 后吸弃原培养液及未贴壁的细胞,换新的 DMEM 培养液培养,于相应时间点换含 $0.086\mu\text{mol/L}$ 冰片(10% 冰片血清)的 DMEM 培养液或新鲜完全 DMEM 培养液,使冰片的作用时间分别为 4h、24h,实验分为冰片作用 4h 组、冰片作用 24h 组、冰片作用 24h 后去除冰片血清换新鲜完全 DMEM 培养液继续培养 24h 组和空白家兔血清作用 24h 组等 4 种处理组;作用相应时间后,立即吸弃原培养液,用含 2.5% 戊二醛的

甲酸钠缓冲液(pH7.35, 4℃)固定 1h,然后将细胞层刮下(应呈连续的细胞膜片状),并用 1% OsO_4 固定 1h,不同浓度乙醇梯度脱水, Epon-812 包埋,超薄切片,醋酸铅染色,电镜下观察细胞间紧密连接和细胞吞饮囊泡的变化情况。

结 果

冰片对 MDCK 细胞之间的紧密连接有明显影响与完全培养液组和空白家兔血清组比较,细胞间紧密连接结构减少;同时,MDCK 上皮细胞内吞饮囊泡的数量增多、粒径增大。图 1 为未经冰片血清处理的 MDCK 细胞,透射电镜下可见大量的细胞紧密连接结构;图 2 为经 $0.086\mu\text{mol/L}$ 冰片处理 4h 后的 MDCK 上皮细胞,可见细胞间紧密连接已经开始打开,并且紧密连接结构也变少,但此时并未见大量的囊泡形成;图 3 为 $0.086\mu\text{mol/L}$ 冰片处理 24h 后的 MDCK 上皮细胞,可见细胞紧密连接结构明显减少,细胞内细胞吞饮囊泡数量明显增加、粒径明显增大;图 4 为经 $0.086\mu\text{mol/L}$ 冰片处理 24h 后去除冰片血清,换新鲜完全

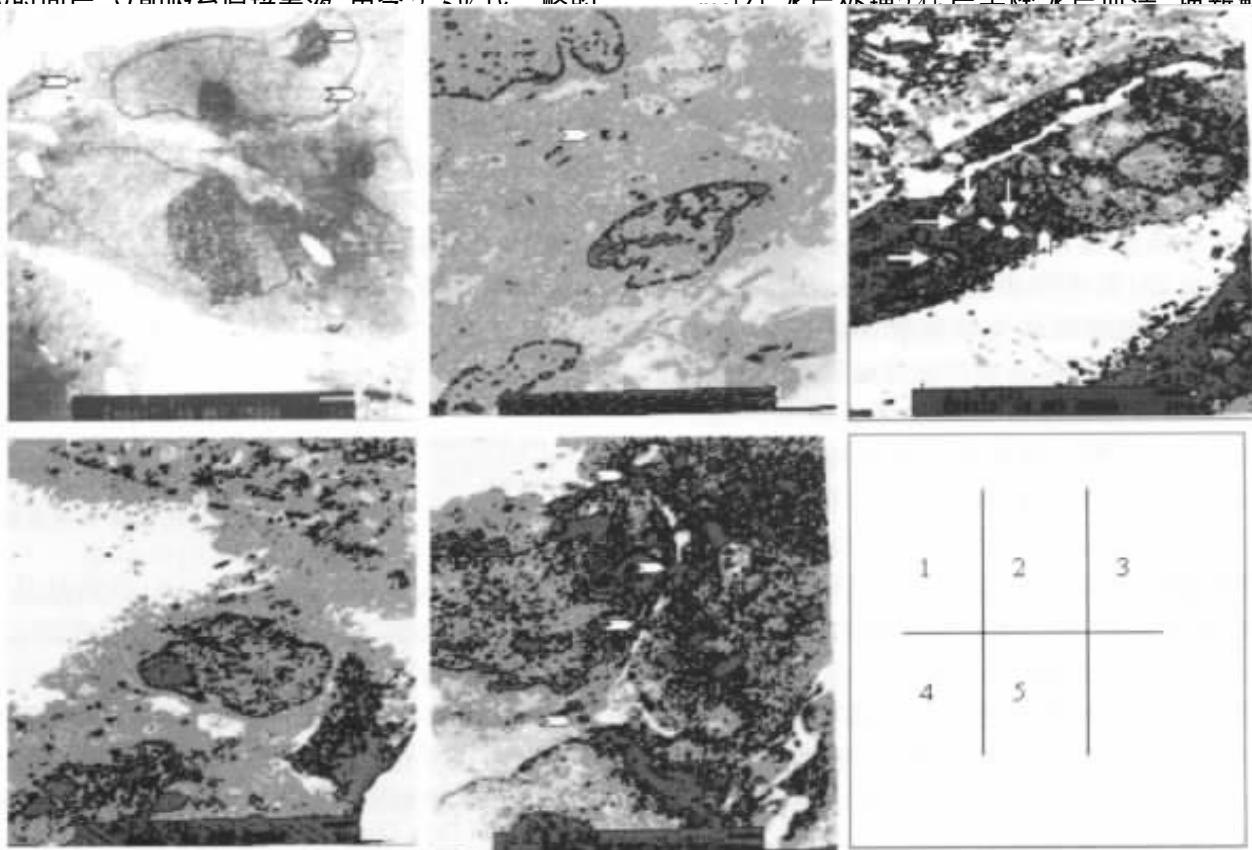


图 1 完全培养液处理 MDCK 上皮细胞透射电镜结果, \Rightarrow 示细胞间紧密连接结构,基本未见细胞吞饮囊泡($\times 5000$);图 2 含 $0.086\mu\text{mol/L}$ 冰片处理 MDCK 上皮细胞 4h 后,透射电镜结果(10K);图 3 含 $0.086\mu\text{mol/L}$ 冰片处理 24h 后,透射电镜结果图, \rightarrow 示细胞吞饮囊泡;图 4 含 $0.086\mu\text{mol/L}$ 冰片处理 24h,然后去除冰片血清培养 24h 后透射电镜结果($\times 5000$);图 5 空白家兔血清培养液处理 24h 后透射电镜结果(15K);Bar=1 μm

DMEM 培养液培养 24h 后的电镜图,可见细胞间紧密连接、细胞内囊泡的数量和粒径又恢复到冰片血清作用之前的水平。图 5 为空白家兔血清处理 24h 后的电镜结果图,可见较多的细胞间紧密连接结构,细胞内缺乏细胞吞饮囊泡,与完全 DMEM 培养液处理的 MDCK 细胞完全一样,说明在培养过程中空白家兔血清对 MDCK 上皮细胞间紧密连接无影响。

讨 论

BBB 由脑微血管内皮细胞紧密连接构成,这些内皮细胞是由侵入胚胎的神经外胚层外周神经血管丛微血管内皮细胞通过血管形成机制分化而来,它们与外周微血管内皮细胞之间至少存在有以下区别^[1,2] (1) 细胞之间的连接非常紧密,并且具有很高的跨细胞电阻,抑制了经细胞间的分子透过 (2) 具有相对缓慢而少量的液体细胞吞饮过程,因为细胞内缺乏介导这一过程的囊泡 (3) 细胞上具有一些特殊的转运载体以及一些特殊酶的大量表达,能让一些特殊的物质透过 BBB。以上特性决定了 BBB 具有选择性透过性,透过率与物质的亲脂性成“S”形相关,只允许油/水分布系数对数值($\log PC_{油/水}$) ≤ 0 的分子通过,反之则不能。而临床应用的多种药物的 $\log PC_{油/水} > 0$,很少能通过 BBB,治疗中枢性疾病时则不发挥作用。但由于 BBB 结构的特殊性,在体实验比较困难,故而建立合适的 BBB 体外模型是首要任务。自从 Goldman E 发现 BBB 的存在后,很多学者致力于这一方面的研究,应用脑微血管内皮细胞体外培养建立血脑屏障体外模型,取得了一定进展,但是发现脑微血管内皮细胞在体外很容易丢失部分甚至全部的生理学特性,并且有生存时间短、传代次数少等缺点。MDCK 细胞系为狗肾上皮细胞发展的一种细胞间连接非常紧密的细胞系,其许多生理特性均与 BBB 非常相似,如跨细胞高电阻、细胞间的紧密连接、酶学特性、抗原性(Factor III)、P-糖蛋白的表达等,国外常用其代替 BBB 用于体外药物透过 BBB 的筛选模型^[3]。

有文献报道^[4,5],冰片能促进庆大霉素、伊文思兰等大分子亲水性物质的 BBB 透过率,这些物质透过 BBB 的方式即为经细胞间的被动扩散,故认为冰片开放 BBB 与开放细胞间紧密连接有关。 $0.086\mu\text{mol/L}$

的冰片作用 4h 后即能使 MDCK 细胞间紧密连接开放,细胞紧密连接点结构减少。 $0.086\mu\text{mol/L}$ 的冰片作用 24h 移除冰片血清再培养 24h 后,MDCK 细胞间紧密连接结构又恢复至正常状态,也提示冰片对血脑屏障的作用是可逆的。细胞间紧密连接结构的存在和发育成熟主要与细胞间 ICAM-1、ZO-1(zonula protein)蛋白分子以及 Ca^{2+} 浓度有关,ZO-1 蛋白的阳性表达或表达量增大、细胞内 Ca^{2+} 浓度升高均可增强细胞间紧密连接。另外 BBB 细胞膜上的一些特殊蛋白质对其屏障作用也有重要贡献,如 p-糖蛋白等。本实验室先前研究结果表明,冰片对 MDCK 细胞膜上 p-蛋白的活性一直具有抑制作用^[6],提示冰片开放血脑屏障的机制可能也有 p-蛋白的参与。

参 考 文 献

- Brightman MW. The anatomic basis of blood-brain barrier. In Neuweil EA. ed. Implications of the blood-brain barrier and its manipulation. Vol. 1. Basic Sciences Aspects. New York: Plenum Publishing Corp, 1989:53—83
- Gospodarowicz D. The control of proliferation and differentiation of endothelial cells. In Nossel HL and Vogel HJ. eds. Pathobiology of the endothelial cells. Acad Press New York 1982:19—62.
- Veronesi B. Characterization of the MDCK cell line for screening neurotoxicants. Neurotoxicol 1996;17(2):433—444.
- 梁芙蓉,叶少梅,张银卿,等.冰片对家兔、大鼠脑组织伊文思蓝染色作用的观察.广州中医学院学报 1993;10(4):211—213.
Liang MR, Ye SM, Zhang YQ, et al. Effect of borneol on the permeability of blood-brain barrier: observing the effect of borneol on the staining of rabbit and rat brain with Evans blue. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med 1993;10(4):211—213.
- 刘启德,梁芙蓉,陈芝喜,等.冰片对庆大霉素透血脑屏障的影响.广州中医学院学报 1994;11(1):37—40.
Liu QD, Liang MR, Chen ZX, et al. Effect of borneol on BBB-penetrating of sulfate gentamycin. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med 1994;11(1):37—40.
- 陈艳明,王宁生.冰片对 P-糖蛋白的影响.中药新药与临床药理 2003;14(2):96—98.
Chen YM, Wang NS. Effect of borneol on the P-glycoprotein. Tradit Chin Drug Clin Pharmacol 2003;14(2):96—98.

(收稿 2003-12-29 修回 2004-03-12)