

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.20.025

## 应用 U251 胶质瘤细胞、脑内皮细胞和周细胞体外构建血瘤/脑屏障模型的研究\*

杨海洋<sup>1</sup>, 蔡理<sup>2</sup>, 龙江<sup>1△</sup>, 何吉洪<sup>1</sup>

(1. 昆明医科大学第一附属医院神经外科, 昆明 650032; 2. 南华大学附属第一医院神经外科, 湖南衡阳 421001)

**摘要:**目的 利用人脑微血管内皮细胞(hBMEC)、脑周细胞(PC)和 U251 胶质瘤细胞(以下简称 U251)非接触共培养体外构建稳定的三联血瘤(脑)屏障(BTB/BBB)模型。方法 3 种细胞传代培养达一定数目,应用 Transwell 插槽体外共培养构建 BTB/BBB 模型,经 4 h 试漏试验、倒置显微镜等观察形态学改变、免疫荧光技术观察 Claudin-5、Occludin 表达情况及模型对辣根过氧化物酶(HRP)通透性试验评价模型屏障功能。结果 hBMEC 呈现出典型的鹅卵石样外观,非接触共培养后呈单层梭形生长,出现其特有的“漩涡”状,形态呈长梭形;PC 外形不规则,具有重叠生长特性;U251 呈典型的肿瘤细胞生长特性。3 种不同方法构建的模型液面试漏实验均出现一定液面差;免疫荧光显示 hBMEC 细胞间形成连续而致密的连接,但强弱不等。3 种模型对 HRP 通透性显示:单纯 hBMEC 为  $43.490\% \pm 3.572\%$ 、hBMEC + U251 为  $36.540\% \pm 1.475\%$ 、hBMEC + PC + U251 为  $26.460\% \pm 2.372\%$ ,差异有统计学意义( $t=19.330, P<0.05$ )。结论 hBMEC+PC+U251 非接触共培养模型的形态结构及屏障功能均比单纯 hBMEC 和 hBMEC+U251 更优越,具备更完善的 BTB/BBB 基本特征和功能,为今后体外研究 BTB/BBB 的功能和调控机制及药物筛选提供一种新型体外模型工具。

**关键词:**血瘤屏障;内皮细胞;周细胞;U251 胶质瘤细胞

中图分类号:R322.8

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)20-2613-04

### Establishment of an blood-brain/tumor barrier modal in vitro by coculturing brain endothelial cells, pericytes and U251\*

Yang Haiyang<sup>1</sup>, Cai Li<sup>2</sup>, Long Jiang<sup>1△</sup>, He Jihong<sup>1</sup>

(1. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract: Objective** To establish a stable in vitro model of blood-brain/tumor barrier (BBB/BBT) simulating in vivo state using the human brain endothelial cells(hBMEC), brain pericytes (PC) and U251 glioma cells(U251). **Methods** An in vitro model of BBB/BBT was constructed using Transwell inserts(pore size  $1.0 \mu\text{m}$ ) coculture while three cell subculture reaches a certain number. Its barrier function was evaluated by the 4-hour leakage test, inverted microscope to observe morphological changes, horseradish peroxidase permeability test and tight junction protein Claudin-5 and Occludin identification expression observed by immunofluorescence technology. **Results** hBMEC monolayers demonstrated a typical cobblestone-like appearance, Non-contact spindle cocultured monolayer growth appeared its unique "swirl pool" shape, fusiform morphology; the pericytes displayed irregular shape and overlapping grow; U251 showed typical tumor cell growth. Fluid leakage test were interviewing a certain level difference in three different ways to build models; immunocytochemical staining showed a continuous and dense tight junction formed between the endothelial cells but intensity ranging; horseradish peroxidase permeability of three different models showed that pure hBMEC ( $43.490 \pm 3.572\%$ ), hBMEC+U251 ( $36.540 \pm 1.475\%$ ), hBMEC+PC+U251 ( $26.460 \pm 2.372\%$ ) was significantly lower, the difference was statistically significant ( $t=19.330, P<0.01$ ). **Conclusion** hBMEC+PC+U251 cocultured the morphology, tructure and barrier function have more advantages than pure hBMEC and hBMEC+U251, have the basic characteristics and function of BTB/BBB, and they have provided a new tool reseach function, regulation mechanisms and drug screening the BTB/BBB in future.

**Key words:** blood-brain barrier; endothelial cells; pericytes; U251 glioma cells

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)是维持脑组织内环境稳定的重要结构,中枢神经系统疾病的发生、发展与 BBB 功能有着密切关系。正常的 BBB 主要由脑血管内皮细胞、星形胶质细胞终足、周细胞及血管基底膜构成,而脑毛细血管内皮细胞之间的紧密连接结构是 BBB 的结构基础<sup>[1-3]</sup>。在体研究所受的影响因素较多,要从细胞和分子水平深入理解 BBB 的功能调控机制及药物筛选方面带来很大限制,因此,体外模拟在

体环境建立 BBB 模型是目前研究 BBB 的功能、调控机制及药物筛选主要工具。

目前,体外构建 BBB 模型主要有以下几种方式<sup>[4-5]</sup>:(1)单层脑血管内皮细胞;(2)内皮细胞+星形胶质细胞;(3)脑血管内皮细胞+周细胞;(4)脑血管内皮细胞+星形胶质细胞+周细胞。血瘤屏障(blood-tumor barrier, BTB)构建方式主要有以下几种:(1)鼠脑血管内皮细胞+C6 胶质瘤细胞;(2)人脐静

\* 基金项目:2011 年云南省应用基础研究面上项目(2011FZ116)。

作者简介:杨海洋(1985-),硕士,主要从事脑肿瘤的临床与基础研究。

△ 通讯作者, E-mail: longjiang69@163.com。

脉内皮细胞+C6 胶质瘤细胞。在 BTB 的研究中,还存在着明显不足,细胞种类不完善或者细胞种属来源不一致,都是影响其研究的重要因素。国内外研究表明,脑周细胞(PC)在 BBB 的形成、结构和功能上具有不可替代的作用,在胚胎的发育过程中对 BBB 的结构完善方面也具有重要作用<sup>[6]</sup>。另有研究显示,PC 有调节 BBB 中内皮细胞特异性基因的表达作用,从而改变 BBB 的通透性<sup>[7]</sup>。因而,在原有 BTB/BBB 研究的基础上,构建一种有 PC 参与的 BTB/BBB 体外模型,对进一步研究 BTB/BBB 各种功能调控机制具有重要意义。

本研究参考文献[4]报道,利用人脑微血管内皮细胞(hBMEC)、PC 和 U251 胶质瘤细胞(U251)在 Transwell 共培养系统中非接触共培养构建体外 BTB 模型,对该模型紧密连接和通透性进行鉴定,并对其与单纯 hBMEC 模型和 hBMEC+U251 的二联模型的紧密连接性和通透性进行比较,为体外研究 BTB/BBB 建立一种新型可靠的模型工具。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** hBMEC 购自上海通派生物技术有限公司,PC 由第三军医大学西南医院病理学研究所惠赠,U251 购自上海中科院细胞库,DMEM/F12 培养基购自美国 Invitrogen 公司,胎牛血清购自杭州四季青有限公司,青霉素/链霉素双抗购自石家庄中诺药业有限公司,Transwell 插槽(1.12 cm<sup>2</sup>,1.0 μm 孔径)购自美国 Corning 公司。鼠抗人多克隆闭合 Claudin-5 抗体、咬合蛋白 Occludin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;二抗:TRITC 标记的山羊抗鼠 IgG 购自北京中杉公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将冻存于液氮中的 hBMEC、PC 和 U251 取出迅速放入事先预热的 40 ℃ 水浴箱中振荡溶解冻存细胞,在无菌操作台内将冻存管中的细胞分别移入 25 mL 培养瓶中,每瓶加入预先配制的含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM/F12 培养液,放入 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养,24 h 换液,每天在光镜下观察细胞生长情况,隔天换液,传代培养至后续实验所需细胞总量。

**1.2.2 体外 BTB/BBB 模型的构建** 根据在体环境的 hBMEC 和 PC 的大致比例确定所需接种 hBMEC 和 PC 的细胞数量<sup>[8]</sup>。将培养瓶中培养的 PC 和 U251 用 0.05% 的胰酶消化、离心和计数。首先将 12 孔 Transwell 插槽倒在 6 孔培养皿中,将 PC(2.0×10<sup>4</sup> 个)接种于明胶包被的 Transwell 半透薄膜下层上,同时在 12 孔培养皿中接种 U251(每孔 1.5×10<sup>4</sup> 个),放入细胞培养箱里培养 4 h,光镜下观察确认两种细胞完全贴壁,分别将 6 孔培养板中的 Transwell 翻正移入接种有 U251 的 12 孔中。再用 0.05% 的胰酶消化培养瓶中的 hBMEC,离心和计数,在接种了 PC 和 U251 的插槽上室中接种 2.0×10<sup>5</sup> 个 hBMEC 和在只接种 U251 的插槽上室接种相同细胞数的 hBMEC,构建 hBMEC+PC+U251 三联模型和 hBMEC+U251 二联模型,再设一组单独接种 hBMEC,同时设一个未接种任何细胞的 Transwell 空白对照模型组。接种好各组细胞后仍放回细胞培养箱中继续培养,以后隔天换液并在光镜下观察细胞生长形态,非接触共培养 5~7 d。

**1.2.3 4 h 液面渗漏试验** 参照文献[9]的试验方法,非接触共培养 5 d 后,对 3 种模型进行液面渗漏试验,在 3 种模型的 Transwell 插槽的上、下室同时加入相同细胞培养液,上室液面比下室高出 0.5 cm,放回原细胞培养箱中继续培养 4 h,4 h 后

分别与未接种任何细胞的空白 Transwell 插槽液面作对比,然后 3 种模型的液面差分别做比较。

**1.2.4 辣根过氧化物酶(HRP)检测体外 BTB/BBB 通透性** 参照文献[10]的方法,取 4 h 液面渗漏试验阳性的模型进行 HRP 通透性检测,去掉 Transwell 插槽原有的细胞培养液,然后在插槽上室中加入含有 HRP 500 ng 的通透性试验用培养液(无酚红 DMEM 培养基,其余成分相同)920 μL,受池中加入相同培养基 2 280 μL,使细胞插槽内外液面相平,以消除液面差产生的静压力对通透性的影响。放回培养箱中继续培养 24 h,细胞培养结束,从插槽下室中各取样 100 μL,放入 96 孔培养板中,待所有取样结束后,每孔加入二甲基联苯胺溶液和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液各 100 μL,显色 10 min,加入 100 μL 浓度为 1 mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度(A)值;取 HRP 10 ng/mL,用无血清 DMEM 培养基倍比稀释,同法显色并测定 A 值,绘制浓度对应 A 值的标准曲线。因为 A 值与 HRP 浓度(C)具有良好的线性关系,线性方程为  $A = 0.3811C + 0.0981$ ,  $R^2 = 0.9969$ ,因而根据各个样品测得的 A 值,利用标准曲线公式计算各组细胞 HRP 通透率。HRP 通透率=(受池 HRP 浓度×受池培养液体积)/(供池 HRP 浓度×供池培养液体积)×100%。

**1.2.5 利用免疫荧光技术鉴定紧密连接蛋白** 通透性测定结束后,用手术刀片将 Transwell 完整切下,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次,4% 的多聚甲醛固定 15 min,PBS 清洗 3 遍,加入 1% 用 pH=7.2 的 PBS 配置小牛血清封闭 20 min,PBS 清洗 3 次,加入检测相应一抗(浓度均为 1:50),4 ℃ 下过夜,对照组用 PBS 代替一抗,其余条件相同;次日,用 PBS 将一抗洗净,室温下加入适当浓度的二抗(浓度为 1:50),室温下避光浮育 40~60 min 后,用 PBS 将二抗彻底洗净,然后将细胞置于荧光显微镜下检测两种蛋白在不同模型上的表达情况。

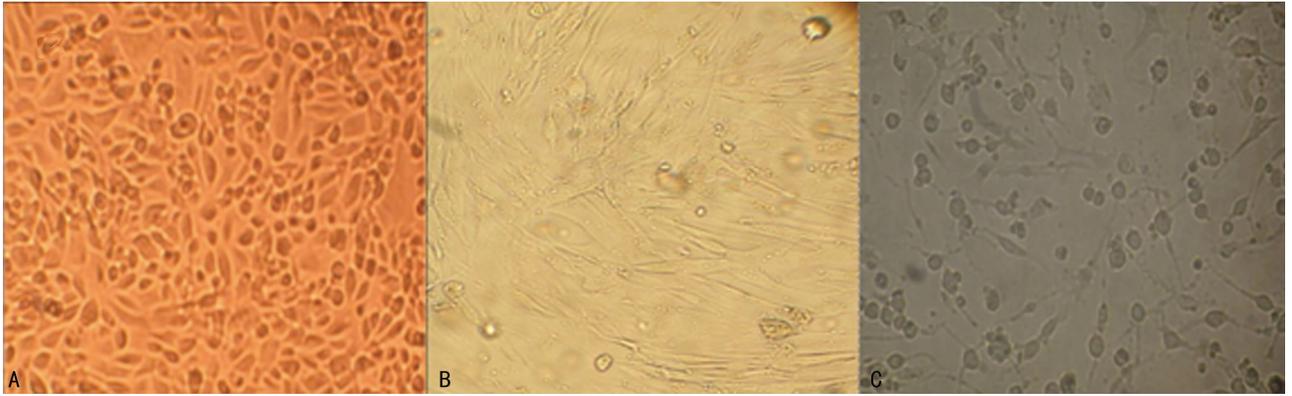
**1.3 统计学处理** 利用 SPSS18.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 培养细胞光镜下生长情况** hBMEC 体外培养,光镜下呈明显的“铺路石”样,符合典型的 hBMEC 外形;培养的 PC 呈不规则外形,重叠生长,符合典型的 PC 生长形态;培养的 U251 生长情况,见图 1。

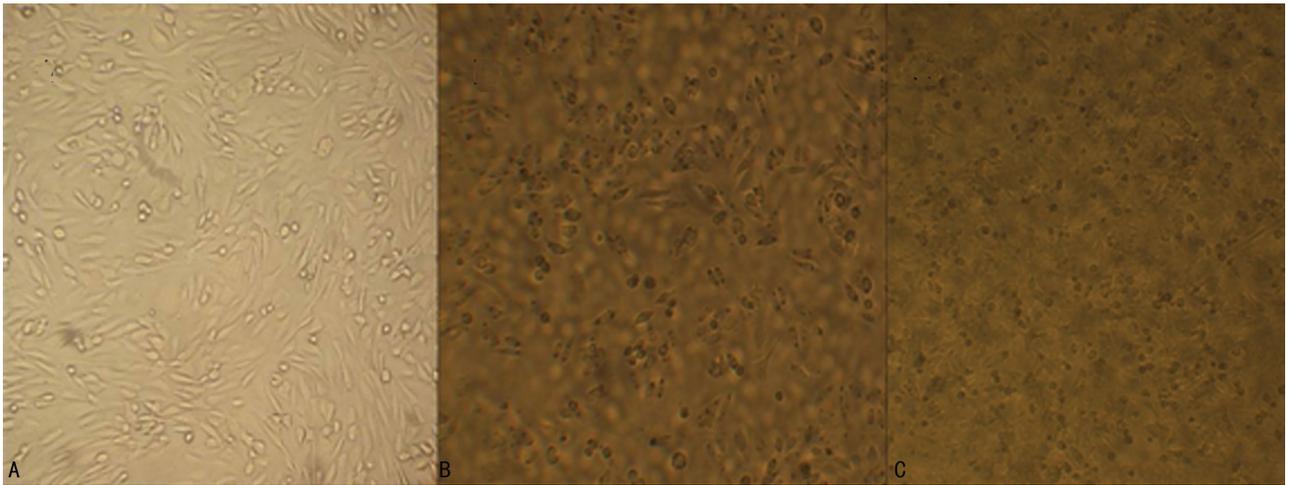
**2.2 液面渗漏试验比较** 本试验中 3 种模型与设置的未接种任何细胞的空白对照组相比,均有保留了一定的液面差,未接种细胞的空白对照组不能维持液面差。3 种不同模型相比较,液面差维持情况依次为 hBMEC+PC+U251 > hBMEC+U251 > hBMEC,并且 hBMEC+PC+U251 的液面差几乎保持到 0.5 cm。

**2.3 体外 BTB 模型的形态学鉴定** hBMEC 接种于明胶包被的 Transwell 插槽上,非接触共培养后仍呈单层贴壁生长,5 d 左右基本形成融合状态,出现其特有的“漩涡”状,hBMEC 生长形态呈长梭形,表现出接触性抑制生长的特性,其生长特性符合典型内皮细胞生长的特征;hBMEC+U251 和 hBMEC+PC+U251 非接触共培养光镜下整体观,形成致密的连接(图 2)。免疫荧光检测 hBMEC 中闭合蛋白 Claudin-5 和咬合蛋白 Occludin,均表达于 hBMEC 的边缘。在不同的模型中 hBMEC 上闭合蛋白 Claudin-5 和咬合蛋白 Occludin 表达强度有差异,见图 3。



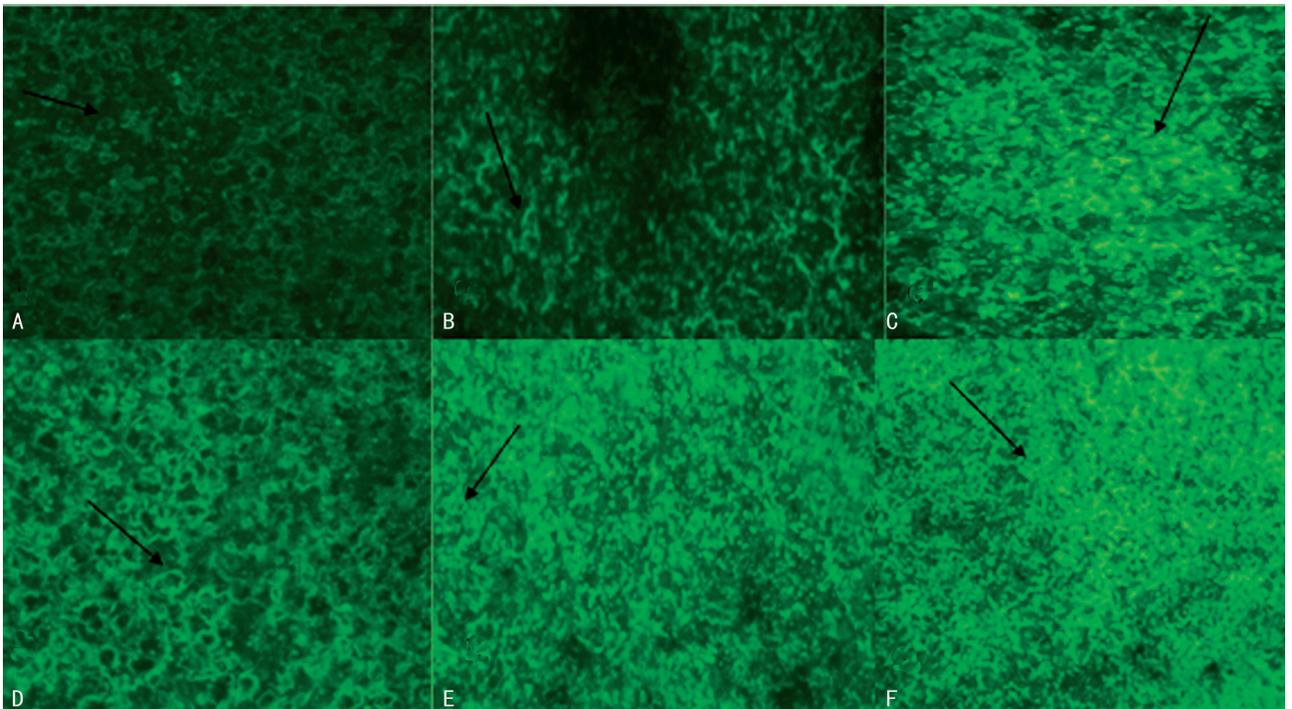
A;hBMEC;B;PC;C;U251。

图 1 3 种细胞生长培养生长情况(×100)



A:单纯培养 hBMEC 在 Transwell 膜上生长情况;B:hBMEC+U251 模型上生长情况;C:hBMEC+PC+U251 模型上生长情况。

图 2 3 种模型光镜下细胞生长整体形态(×100)



A:单纯 hBMEC 模型上 Claudin-5(×200);B:单纯 hBMEC 模型上 Occludin(×200);C:hBMEC+U251 模型上 Claudin-5(×200);D:hBMEC+U251 模型上 Occludin(×200);E:hBMEC+U251 模型上 Claudin-5(×100);F:hBMEC+U251 模型上 Occludin(×100)。

图 3 3 种模型中 hBMEC 上免疫荧光检测 Claudin-5、Occludin 表达情况

**2.4 体外 BTB 模型通透性测定结果** 3 种模型对 HRP 通透性大小为单纯 hBMEC $43.490\% \pm 3.572\%$ 、hBMEC+U251 为  $36.540\% \pm 1.475\%$ 、hBMEC+PC+U251 为  $26.460\% \pm 2.372\%$ ，单纯 hBMEC > hBMEC+U251 > hBMEC+PC+U251。限制 HRP 通透作用按单纯 hBMEC、hBMEC+U251、hBMEC+PC+U251 依次增强(图 4)，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

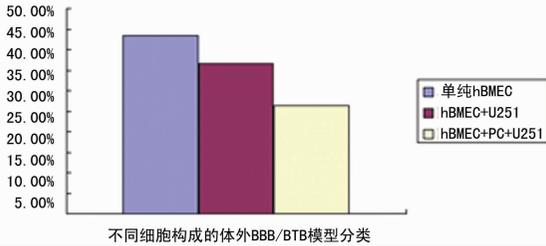


图 4 3 种不同方法构建 BTB/BBB 模型对 HRP 通透性的比较

### 3 讨 论

体外 BBB/BTB 的研究中,最常用到的细胞为内皮细胞,内皮细胞的来源较为广泛,常见的有:人脐静脉内皮细胞、主动脉内皮细胞、小鼠脑血管内皮细胞等。目前,体外 BBB 研究主要的方法为模拟在体状态,但在相关实验研究中细胞来源物种却未统一,这样给实验研究带来一些不利因素。对细胞来源要求并没有统一的标准,本研究利用 hBMEC、PC 和 U251,将细胞来源物种统一为人进行非接触共培养构建模型,比较接近人体在体环境状态,也有较好的重复性,在同类研究原有基础上的进一步改进。

对 BBB/BTB 研究认识,证实 hBMEC 是 BBB/BTB 的主要组成细胞,因而在本实验研究对 hBMEC 细胞质量的要求高,hBMEC 细胞的质量好坏对本研究有一定的影响。本研究中所采用 hBMEC 细胞系第 4 代细胞,该细胞优点在于细胞状态好,纯度较高,可多次传代,可重复性好;其缺点是细胞代数较原代培养细胞高,不如原代细胞接近在体细胞表型特征;另外,在该模型中,3 种细胞均为非接触共培养,hBMEC 在模型中接种于 Transwell 插槽上室,PC 接种与 Transwell 插槽明胶包被的 Transwell 半透薄膜上,而 U251 则接种在 12 孔培养皿底部,虽然 3 种细胞均接种于同一个培养系统里,但 3 种细胞间互不接触,缺乏了细胞之间直接接触相互作用影响,对模型的通透性等功能结构也会有一定的影响。

液面试漏试验出现液面差,说明 BBB/BTB 屏障功能初步形成。本研究中设置了一个未接种任何细胞的空白模型与 3 种模型做液面试漏试验作对照,共培养 5 d 后,与空白组比较均出现一定的液面差,但只有 hBMEC+PC+U251 维持的液面差和初始设置的上下室液面差基本保持一致,说明在控制了细胞浓度和培养时间相同的情况下 hBMEC+PC+U251 模型组比 hBMEC+U251 和单纯 hBMEC 形成 BBB/BTB 结构功能的时间短而且屏障功能好。从分子层面上看,hBMEC 的紧密连接是 BBB/BTB 的结构基础,所以 hBMEC 紧密连接是研究 BBB/BTB 结构变化的核心。闭合蛋白 Claudin-5 和咬合蛋白 Occludin 是 hBMEC 紧密连接重要的跨膜蛋白,对 hBMEC 紧密连接条带具有不可替代的作用<sup>[11]</sup>。在本实验中,利用免疫

荧光的方法检测了各模型上 hBMEC 的主要紧密连接蛋白 Claudin-5 和 Occludin,在荧光实验中发现,hBMEC 的边缘间形成致密而连续的紧密连接,表明模型具有很好的密封屏障的功能。这些实验结果可以从形态学方面证明了在本研究中构建的模型已经具备了 BBB/BTB 结构基础。由于实验室设备的原因,本研究中未能测跨内皮电阻 TEERs,没有从模型产生电阻特征方面去证明 3 种模型特点,另外考虑到 Transwell 膜本身比较脆弱和膜上细胞容易被摩擦脱落的特点,电镜标本切片制作困难,因此本研究未在电镜下观察 3 种模型的紧密连接结构形成做比较。

建立一个良好的 BBB/BTB 模型,不仅要具备形态学方面的特征,还有很重要的一点就是要鉴定评价其屏障功能的好坏。在屏障功能鉴定方面有两个重要的参数,就是跨内皮电阻 TEERs 和通透性<sup>[12]</sup>。在本研中选用了 HRP 检测评价 3 种方法构建的模型的通透性,避免了放射性物质污染,而且具有实验操作简单、快捷,仪器设备要求不高等优点。有文献报道该细胞浓度的接种在共培养 5~7 d 屏障功能最好,因而本研究选择第 5 天作为通透性检测的时间点,这与同类实验的参考文献报道是相符合<sup>[13]</sup>。本研究中,hBMEC+PC+U251 和 hBMEC+U251 及单纯 hBMEC 做比较,液面试漏试验液面差结果显示单纯 hBMEC < hBMEC+U251 < hBMEC+PC+U251;免疫荧光检测显示 hBMEC+PC+U251 的紧密连接蛋白 Claudin-5 和 Occludin 比 hBMEC+U251 和单纯 hBMEC 致密而更加连续和封闭,而 hBMEC+U251 和单纯 hBMEC 作比较,hBMEC+U251 相对于单纯 hBMEC 更为连续致密封闭;对 HRP 的检测结果显示出相对应的趋势,对其通透性为单纯 hBMEC > hBMEC+U251 > hBMEC+PC+U251,这一结果表明紧密连接蛋白 Claudin-5 和 Occludin 表达连续封闭致密性越好,对 HRP 的通透性越差。从形态学和屏障功能上看是相对应的,也说明了构建的 hBMEC+PC+U251 的体外 BBB/BTB 屏障功能比 hBMEC+U251 和单纯 hBMEC 具有更优越的屏障功能。

综上所述,hBMEC 和 PC 及 U251 三联模型在形态、结构和功能等方面都比另外两种模型更加完善和优越,更加接近在体 BTB/BBB 状态,是一种可靠的体外 BTB/BBB 模型,而且在本研究中采用的细胞物种来源均来自人,纠正了以往多数研究报道的细胞不属于同一物种来源的现象,更接近人类在体环境,为进一步研究 BBB/BTB 功能变化和研究 BBB/BTB 跨膜药物筛选及各种脑血管疾病研究提供了一种新型体外模型构建方式。另外,也为进一步研究周细胞参与 BBB/BTB 功能机制调控提供了最新的体外模型工具。

### 参考文献:

- [1] 林志雄,黄强,杨丽娟,等.胶质瘤血瘤屏障体外模型的形态学观察[J].解剖学报,2004,35(3):257-261.
- [2] 陈振斌,林志雄,张弼飞,等.脑胶质瘤的血瘤屏障超微结构观察[J].电子显微学报,2001,20(6):679-684.
- [3] 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.

- [2] Muschen M, Warskulat U, Beckmann MW. Defining CD95 as a tumor suppressor gene[J]. *J Mol Med*, 2000, 78(6): 312-325.
- [3] Huang QR, Morris D, Manolios N. Identification and characterization of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas(CD95) gene[J]. *Molecul Immunol*, 1997, 34(8/9): 577-582.
- [4] Kanemitsu S, Ihara K, Saifuddin A, et al. A functional polymorphism in Fas(CD95/Apo-1) gene promoter associated with systemic lupus erythematosus [J]. *J Rheumatol*, 2002, 29(6): 1183-1188.
- [5] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2): 74-108.
- [6] Sun T, Miao XP, Zhang XM, et al. Polymorphisms of death pathway genes Fas and FasL in esophageal squamous-cell carcinoma [J]. *J Nati Cancer Inst*, 2004, 96(13): 1030-1036.
- [7] Li SY, Yu B, An P, et al. Influence of FasL gene expression on hepatic metastasis of colorectal carcinoma [J]. *Hepat Pancreat Dis Int*, 2004, 3(2): 226-229.
- [8] Nomori H, Watanabe S, NaKajima T, et al. Histiocytes in nasopharyngeal carcinoma in relation to prognosis [J]. *Cancer*, 1986, 57(1): 100-105.
- [9] Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and Cancer [J]. *Oncogene*, 2004, 23(16): 2950-2966.
- [10] Ferreira LD, Pulawa LK, Jensen DR, et al. Overexpressing human lipoprotein lipase in mouse skeletal muscle is associated with insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2001, 50(5): 1064-1068.
- [11] Chang YC, Xu YH. Expression of Bcl-2 in habited Fas-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma BEL-7404 cells [J]. *Cell Res*, 2000, 10(3): 233-242.
- [12] 张柏林, 孙瞳, 刘海洁, 等. Fas 和 FasL 基因多态性增加乳腺癌发病风险 [J]. *中国医药导刊*, 2009, 11(12): 2096-2098.
- [13] Hashemi M, Fazaeli A, Ghavami S, et al. Functional polymorphisms of Fas and FasL gene and risk of breast cancer-pilot study of 134 cases [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53075.
- [14] Zhang ZZ, Xue HC, Gong WD, et al. Fas promoter polymorphisms and cancer risk; a meta-analysis based on 34 case-control studies [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(3): 487-493.
- [15] Knechtel G, Hofmann G, Gerger A, et al. Analysis of common germline polymorphisms as prognostic factors in patients with lymph node-positive breast cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(12): 1813-1819.
- [16] Crew KD, Gammon MD, Terry MB, et al. Genetic polymorphisms in the apoptosis-associated genes Fas and FasL and breast cancer risk [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(12): 2548-2551.

(收稿日期: 2014-03-08 修回日期: 2014-04-09)

(上接第 2616 页)

- [4] Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, et al. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes [J]. *Neurochem Int*, 2009, 54(3/4): 253-263.
- [5] Pan W, Tu H, Kastin AJ. Differential BBB interactions of three ingestive peptides: obestatin, ghrelin, and adiponectin [J]. *Peptides*, 2006, 27(4): 911-916.
- [6] Dore-Duffy P, Wang S, Mehedi A, et al. Pericyte-mediated vasoconstriction underlies TBI-induced hypoperfusion [J]. *Neurol Res*, 2011, 33(2): 176-186.
- [7] Fisher M. Pericyte signaling in the neurovascular unit [J]. *Stroke*, 2009, 40(Suppl 3): S13-15.
- [8] Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches [J]. *Brain Res Rev*, 2010, 64(2): 328-363.
- [9] 谢英, 叶丽亚, 张小滨, 等. 血脑屏障体外实验模型的建立 [J]. *北京大学学报: 医学版*, 2004, 36(4): 435-438.
- [10] 冯洁, 叶丽亚, 张文健, 等. 人血脑屏障体外实验模型的建立及缺氧-复氧对其通透性的影响 [J]. *中国医药生物技术*, 2008, 3(2): 109-115.
- [11] Bertiaux-Vandaele N, Youmba SB, Belmonte L, et al. The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype [J]. *Am J Gastroenterol*, 2011, 106(12): 2165-2173.
- [12] Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, et al. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2007, 27(6): 687-694.
- [13] 鹿文葆, 秦伟伟, 张秋菊, 等. 脑微血管内皮细胞与周细胞共培养构建体外血脑屏障模型 [J]. *国际脑血管病杂志*, 2012, 20(5): 338-342.

(收稿日期: 2014-01-22 修回日期: 2014-03-06)