Chemother, 2009, 53(12): 5046 – 5054.
[3] 孙长贵. 产 NDM-1 酶细菌研究进展[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(2): 132 – 134.
[4] 卫生部办公厅. 关于开展产 NDM-1 泛耐药菌流行状况调查的通知[Z]. 北京: 卫生部, 卫办疾控函[2010]883 号.
[5] 葛琼, 龚黎明, 严菊英, 等. 浙江省急性驰缓性麻痹相关肠道病毒鉴定分析[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(4): 450 – 452.
[6] 余勍, 余克花, 章清萍, 等. 假丝酵母菌 1070 株对 3 种药物药敏分析[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(4): 474 – 475.
[7] 郑波, 吕媛, 李耘. 携带 bla_{NDM-1} 基因泛耐药肠杆菌科细菌的检测方案[J]. 中国临床药理学杂志, 2010, 11(26): 845 – 848.
[8] 志刚, 朱水荣, 梅玲玲, 等. 肺炎克雷伯菌新德里金属 β-内酰胺酶结构功能分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(3): 28 – 32.

收稿日期: 2013 – 04 – 22　（郭薇编辑　韩仰欢校对）

· 检验技术 ·

纳米氧化铝对血脑屏障毒性影响*

彭慧婷, 高福平, 张勤丽, 牛侨

关键词: 纳米氧化铝; 血脑屏障; 共培养; 通透性
中图分类号: R 114　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2014)04-0527-02　DOI: 10.11847/zgggws2014-30-04-48

纳米材料由于具有许多独特性能(如巨大的表面效应、量子效应等), 因而在生物医药、环境保护等领域有着极广阔的应用前景[1]。但有研究结果显示, 部分人造纳米材料具有毒性, 可以引起氧化应激、炎症反应及其他组织器官的损害[2-3]。目前有越来越多的学者开始关注纳米材料对中枢神经系统的损伤。在正常情况下, 只有亲脂性物质易于通过血脑屏障, 但是纳米颗粒由于其特殊理化特性, 有可能通过不同的途径通过血脑屏障[4-5], 进入脑实质组织中。鉴于目前对纳米铝神经毒性的研究还处于初步阶段, 本研究主要通过原代培养星形胶质细胞和脑微血管内皮细胞来建立血脑屏障模型, 以探讨纳米氧化铝对血脑屏障通透性的影响。

1　材料与方法

1.1　*实验动物*　新生 1 ~ 3dWistar 大鼠, 雌性, 10 只, 清洁级, 由山西医科大学实验动物中心提供〔许可证号: SCXK(晋)2009 – 0001〕。

1.2　*主要试剂与仪器*　纳米氧化铝(美国 Sigma 公司); 达尔伯克改良伊格尔(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基(美国 Gibico 公司); 胰酶(北京邦定生物医学公司); 多聚赖氨酸(Poly-L-Lysine, MW 30000-70000)(美国 Sigma 公司); 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料公司); 马血清(中国新锐生物工程有限公司); EC 专用培养基(北京赛诺科为生物科技有限公司); 羊抗兔[基因科技(上海)有限公司]; Ⅷ因子(太原博士德生物工程有限公司); Transwell 版(3470), (北京德润丰科技有限责任公司)。二氧化碳培养箱(德国 Heraeus 公司); SW-CJ-2F 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); 80-2B 型离心沉淀机(盐城市科学仪器厂); LS-B50L 立式压力蒸汽灭菌器(江阴滨江医疗设备厂); AB104 – N 电子天平(上海电子仪器厂); 透射电镜(日本电子公司); Nicomp-380/ZLS 动电电位粒径测定仪(美国 PSS 公司)。

1.3　*纳米氧化铝粒径及电位测定*　将纳米铝按照染毒浓度制成不同浓度的悬液, 经超声 30 min 混匀后制成纳米颗粒物染毒悬液。采用 Nicomp-380/ZLS 动电电位粒径测定仪测定纳米氧化铝颗粒悬液的 zeta 电位。

1.4　*透射电镜观察纳米氧化铝形态及尺寸*　称取 102 mg 50 nm 纳米氧化铝粉末加入 10 mL 的 DMEM 培养液配成 0.1 mol/L 纳米氧化铝储备液。临用前, 将纳米氧化铝储备液超声混匀 10 min 成为均匀的悬浊液, 吸取 10 mL 滴至有碳膜覆盖的电镜铜网上, 用吸水纸吸去铜网上多余的 DMEM 培养液, 室温放置待铜网完全干燥后, 采用电镜进行观察。

1.5　*脑微血管内皮细胞及星形胶质细胞培养*　在无菌室内, 取大鼠脑皮质制成匀浆, 0.1% Ⅱ型胶原酶消化, 全细胞培养液终止消化。1 000 r/min 离心 10 min。弃上清, 加入 15% 葡聚糖吹打成单细胞悬液, 4 ℃ 4 000 r/min 离心 20 min。参照文献[6]进行脑微血管内皮细胞及星形胶质细胞培养。

1.6　*血脑屏障模型染毒及通透性测定*　血脑屏障

* **基金项目**: 国家自然科学基金(30972456; 81241098)
作者单位: 山西医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 山西 太原 030001
作者简介: 彭慧婷(1987 –), 女, 山西平遥人, 硕士在读, 研究方向: 神经毒理学。
通讯作者: 张勤丽, E-mail: zhangql930611@yahoo.com.cn; 牛侨, E-mail: niuqiao55@163.com
数字出版日期: 2013 – 7 – 31 10:17
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20130731.1017.005.html

体外模型建成后,参考文献[6]有效性鉴定后,以 500 μmmoL 纳米氧化铝对血脑屏障模型进行染毒,分别在 2、4、6、8 h 去除染毒,在供体池中加入 400 μL浓度为 0.02 mg/mL 的芦丁,受体池中加入无血清 DMEM 培养液,加入后 2 h 从受体池中取 400 μL,以无血清 DMEM 培养液调零,用分光光度计测定吸光值。以不同浓度 50 nm 纳米氧化铝对血脑屏障进行染毒,分别为溶剂对照组(无血清 DMEM)及低(125 μmmoL)、中(250 μmmoL)、高纳米氧化铝染毒组(500 μmmoL),8 h 后在供体池中加入 400 μL 浓度为 0.02 mg/mL 的芦丁,受体池中加入无血清 DMEM 培养液,加入后 2 h 从受体池中取 400 μL,以无血清 DMEM 培养液调零,用分光光度计测定吸光值。

1.7　统计分析　采用 SPSS 13.0 软件对各项指标的实验数据进行处理,正态结果用($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析和 LSD-t 检验进行组间比较。

2　结　果

2.1　纳米氧化铝颗粒表征　对不同浓度的氧化铝纳米颗粒进行了透射电镜和扫描电镜观察,纳米氧化铝颗粒呈规则圆形,粒径分布均匀。Nicomp-380/ZLS 动电电位粒径测定仪测定纳米氧化铝颗粒悬液平均粒径为 149.2 nm,电位为 47.6 mV。

2.2　血脑屏障有效性鉴定　(1)4 h 渗漏实验:在显微镜下观察脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMEC)培养至汇合后,将细胞插入器的液面加高,4 h 后,80% 的细胞插入器能够维持 0.5 cm 的液面差,可以将其作为血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)体外模型研究药物的通透性。(2)芦丁的通透性曲线(图 1):0.02 mg/mL 芦丁溶液的最大吸收波长位于 360 nm 处,吸光度值为 0.503,且与 DMEM 培养液的吸收峰不重合,将受体池内 DMEM 的吸光度值调零,每组的 3 个共培养模型测得的吸光度取平均值,获得受体池芦丁溶液的吸光度与时间曲线。

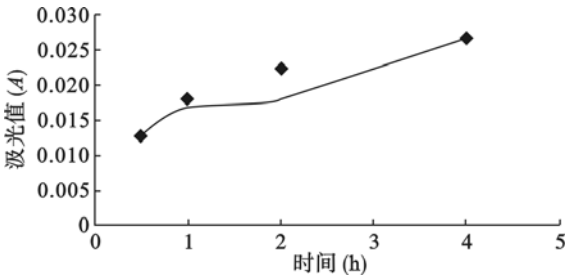

图 1　受体池芦丁吸光度与时间变化曲线

2.3　染毒后血脑屏障通透性　(1)不同染毒时间血脑屏障通透性变化情况:纳米氧化铝染毒 0、2、4、6、8 h 芦丁吸光值分别为(0.441 ± 0.001)、(0.458 ± 0.008)、(0.534 ± 0.009)、(1.047 ± 0.002)、(1.976 ± 0.012),与纳米氧化铝染毒 0h 组比较,2、4、6、8 h 纳米氧化铝染毒组芦丁吸光值均增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。(2)不同染毒浓度血脑屏障通透性变化情况:溶剂对照组及 125、250、500 μmmoL 纳米氧化铝染毒组芦丁吸光值分别为(0.92 ± 0.11)及(1.05 ± 0.04)、(1.44 ± 0.07)、(1.58 ± 0.25),与溶剂对照组比较,250、500 μmmoL染毒组芦丁吸光值均增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3　讨　论

有报道表明,纳米材料可以抑制血管内皮细胞的活性,通过活性氧途径诱导细胞凋亡,产生细胞毒性[7]。蔡文君等[8]发现纳米硫硒化镉能通过血脑屏障,导致小鼠脑细胞和肝细胞 DNA 损伤。

本实验采取脑微血管内皮细胞和星形胶质细胞共同培养建立体外血脑屏障模型,该方法较为简单实用,且能够较为真实地反映 BBB 的结构功能特点,自建立以来就一直成为血脑体外研究的首选[9]。模型建立后,采用纳米氧化铝进行染毒,检测芦丁透过供池进入受池的吸光度,来评价血脑屏障通透性的改变。结果显示,与 0 h 染毒组相比,染毒 2、4、6、8 h 组芦丁吸光值均增加;与溶剂对照组相比,250、500 μmmoL 组芦丁吸光值均增加,均提示血脑屏障通透性发生改变。综上所述,纳米氧化铝可以改变血脑屏障通透性,且随着浓度和时间的增加,其作用更明显。但纳米氧化铝对血脑屏障通透性改变的机制尚不清楚,有待进一步研究。

参考文献

[1]　Ju-Nam Y, Lead JR. Manufactured nanoparticles an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications[J]. Sci Total Environ, 2008, 400(1-3): 396-414.
[2]　张一平. 纳米材料安全性与纳米二氧化硅毒性研究进展[J]. 浙江教育学院学报, 2009, 7(4): 85-90.
[3]　李倩, 唐萌, 马明, 等. 纳米氧化铁对细胞膜流动性影响及其遗传毒性[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(10): 1277-1278.
[4]　Zhu MT, Feng WY, Wang Y, et al. Particokinetics and extrapulmonary translocation of intratracheally in stilldeferricoxide nanoparicles in rats and the potential health risk assessment[J]. Toxicol Sci, 2009, 107(2): 342-351.
[5]　Kwon JT, Hwang SK, Jin H, et al. Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice[J]. J Ocuup Health, 2008, 50(1): 1-6.
[6]　Shayan G, Choi YS, Shusta EV, et al. Murine *in vitro* model of the blood-brain barrier for evaluating drug transport[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 42(1-2): 148-155.
[7]　韩燕, 崔国权, 董淑英, 等. 纳米氧化锌诱导血管内皮细胞凋亡及氧化应激[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(4): 500-502.
[8]　蔡文君, 田熙科, 李岩, 等. 纳米硫酸化镉对小鼠脑和肝 DNA 的损伤[J]. 公共卫生与预防医学, 2008, 19(1): 12-15.
[9]　李珺, 彭亮, 黄胜和, 等. 体外血脑屏障模型的建立及发展[J]. 广东医学, 2009, 30(4): 647-648.

收稿日期:2012-09-01　　(刘铁编辑　韩仰欢校对)