

血脑屏障的研究进展

崔高宇 综述 冯华 王宪荣 审校

(第三军医大学西南医院神经外科, 重庆 630038)

摘要 血脑屏障保护脑组织免受内环境某些因素的影响、维持正常脑细胞功能已为众所周知,但其结构基础及分子机制知者甚少。近年来研究发现,血脑屏障的结构基础为毛细血管内皮细胞、内皮细胞紧密连接、星形细胞、周皮细胞、血管周围的小胶质细胞和基膜构成

的一个复杂的细胞系统,以内皮细胞间紧密连接为主。并相继发现了紧密连接相关蛋白、内皮细胞的吸附内吞、星形胶质细胞与血管之间的微粒正交排列、基膜的第二屏障作用等。文末还综述了血脑屏障通透性的调节及临床意义。

关键词 血脑屏障; 紧密连接, 内皮细胞

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的概念早在一个世纪以前即已提出,本世纪六十年代有人将辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)注入血液,用电子显微镜观察发现,这些示踪剂不能透过脑毛细血管的紧密连接(tight junctions, TJ),认为 TJ 是 BBB 的最主要的结构^[1]。近年更多的研究显示, BBB 是一个复杂的细胞系统,主要由内皮细胞(endothelial cell, EC)、EC 的 TJ、星形细胞(astrocyte)、周皮细胞(pericyte)和血管周围的小胶质细胞(perivascular microglia)以及基膜(basement membrane)构成并维持了 BBB 的特殊功能,对于维持中枢神经系统内环境的稳定起着重要作用。随着细胞生物学以及分子生物学研究的深入,对于 BBB 的结构与功能有了进一步的认识。

1 内皮细胞间紧密连接

Nagy 等^[2]在电子显微镜下观察发现,脑血管 EC 间 TJ 比其它组织中的 TJ 更复杂,构成了一个连续密封的网,是大分子物质经 EC 间路径转运的屏障。Diamond^[3]发现 TJ 具有“门”(gate)功能,可以限制离子和非电解质通过。同时也具有“栅”(fence)功能,阻止脂类化合物在外质膜的自由扩散。因此, TJ 是 BBB 的主要结构基础之一。冷冻蚀刻标本观察发现,相邻细胞融合的 TJ 位点处,细胞外侧断裂面(exoplasmic fracture face, EFF)处膜内微粒呈索状排列并向质膜胞质侧断裂面(protoplasmic fracture face, PFF)延伸,环绕 PFF 形成环状衬沟,这种连续条索以及圆形结构是冷冻蚀刻下 TJ 的主要特点^[4]。不同细胞类型的 TJ 具有的通透性不同,目前,测量 TJ 通透性最敏感的指标是跨内皮电阻(transendothelial electrical resistance, TER),已经测得大鼠脑微血管 TJ 的 TER 达到 6 000 Ω/cm^2 ,远远高于其它组织中 TJ 的 TER^[5]。TJ 冰冻蚀刻结构与 TER 相关性的研究表明,不同类型细胞的 TJ 所具有的条索的数量不同,条索数量越多,TER 值越大,表明 TJ 条索的数量与 TER 明显相关,并发现 TJ 单位面积内圆形结构的密度也与 TER 相关^[6]。

一些研究提示,蛋白合成抑制剂对于 TER 有明显的影响。Stevenson 和 Goodenough^[7]对 TJ 的生物化学特性作了进一步的研究,他们利用小鼠肝脏的 TJ 片段作为抗原,制备了一种单克隆抗体,这种抗体为 225 kDa 的多肽。免疫荧光检测发现,该抗体可以结合于小鼠结肠、肾、睾丸上皮细胞以及睾丸输精小管固有被膜动脉 EC 的连接复合区,也可使 MDCK (Madin-Darey

canine kidney)的上皮细胞的连接复合区染色,被命名为 ZO-1,是发现的第一个发现的 TJ 相关蛋白质^[8],以后相继发现了 Cingulin、ZO-2、7H6 等 TJ 相关蛋白^[9~11]。Itoh 等^[12,13]报道,钙粘蛋白(cadherin)介导的细胞与细胞粘附的膜位点下,存在着一种 220 kDa 的蛋白质,与小鼠的 ZO-1 具有同源性。钙粘蛋白是一种跨膜蛋白质,它能调解 EC 和非 EC 中 Ca^{2+} 依赖的细胞与细胞粘附^[14],去除细胞外钙可以使钙粘蛋白的粘附功能下调^[15],导致 TJ 的功能性开放,提示钙粘蛋白对于 TJ 结构与功能的建立和维护是非常重要的。进一步的研究发现 E-钙粘蛋白与肌动蛋白(actin)有一定的联系,抗 E-钙粘蛋白胞外区的抗体可以导致 TJ 结构与功能的紊乱以及破坏连接的存在^[16],有实验表明,肌动蛋白在 EC 边缘的聚集是维护 TJ 的必要条件^[17]。Itoh 等^[12,13]认为, TJ 可能含有一种尚未证明的钙依赖蛋白,它与 ZO-1/220 kDa 蛋白的亲合力比 E-钙粘蛋白更强,这种钙依赖蛋白可能具有钙蛋白的性质,它可以帮助携带 ZO-1/220 kDa 分子进入细胞与细胞的连接区。Balda 等^[18]提出了一个 TJ 模型:① Ca^{2+} 通过激活细胞表面的细胞粘附分子如 E-钙粘蛋白进而促进相邻细胞的相互作用;② 细胞间联系的信号经 G 蛋白耦连受体传给磷脂酶 C,从而催化磷脂酰基甘油降解成二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)和三磷酸肌醇(inositol 1, 4, 5-trisphosphat, IP3);③ IP3 进而引起细胞内钙库的 Ca^{2+} 释放,并与 DAG 共同激活蛋白激酶 C;④ 蛋白激酶 C 使 E-钙粘蛋白胞内区磷酸化,加强了 E-钙粘蛋白与肌动蛋白的联系。认为 Ca^{2+} 在 TJ 结构与功能中起着重要的作用。

在中枢神经系统的一些区域,内皮细胞没有形成 TJ,允许分子物质在血液和相邻的神经元之间自由交换,这些区域中大部分器官靠近脑室,被称为室周器官(circumventricular organ),它们包括下丘脑、垂体、脉络丛、松果体腺、穹隆下器官和最后区。这些器官中的神经元直接暴露于血液,具有重要的功能。特殊的神经末梢释放出的神经内分泌激素能够自由进入血液从而影响远处的靶器官的活动。同时,这些神经末梢通过对循环中的激素的感知水平对其进行反馈控制。在这些区域,特殊的室管膜细胞也建立一个屏障,将神经组织与脑脊液相隔离^[19]。

2 内皮细胞及其吞饮功能

脑血管 EC 与其它组织 EC 的主要区别在于前者具有复杂的 TJ 和丰富的线粒体,但缺少跨膜转运的质膜小泡(plasma vesicle)以及缺乏细胞孔。经 EC 路径是

中枢神经系统与血液之间物质交换的主要途径之一。除上述特点外,脑血管 EC 的胞膜上含有一些特殊的蛋白质,这些蛋白质在其它组织 EC 膜上不存在或数量很少,这也是脑血管 EC 的一个重要特点。Dermeltzel 和 Krause^[20]复习了脑血管 EC 的酶和受体/转运子,发现碱性磷酸酶、 γ -谷氨酸转氨酶、糖转运蛋白(Glu-1)、转铁蛋白受体是脑血管 EC 特有的。它们与营养物质的转运以及兴奋性氨基酸的选择性去除有关。Manuel 等^[21]研究表明, γ -谷氨酸转氨酶和氨基酸转运系统各自定位于 EC 腔内面和腔外面的膜上,而 5'核糖酶和碱性磷酸酶存在于 EC 的双侧膜上。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶主要位于腔外面的膜上,但是有 25% 位于腔内面膜上。上述特殊物质有可能作为标记物把循环血液中来自中枢神经系统的 EC 鉴别并从 EC 中分离出来,为其研究提供新的途径。

大分子物质转运研究中发现, BBB 以外的血管 EC 包含有大量的小凹内陷和小泡,可能是大量液体及溶质跨细胞转运的基础。另外,小泡也可能融合而形成短暂的通道,为扩散或滤过提供一个穿 EC 隧道(transendothelial tubule)^[22]。Bundgaard 等^[23]用电镜研究发现, EC 中一些与细胞外液相连接的通道与小泡相连,这些通道与组织间液相连接,或者与管腔内面相连接,因此认为它们在某种程度上是质膜的内陷。Nagy 等^[24]采用形态计量学技术定量观察蛙软脑膜血管 EC 中质膜小泡的数量。组织在 20°K 的低温下迅速冰冻,在液氮中用丙酮置换固定,然后在鞣酸、戊二醛、四氧化物和温度 273°K 下固定,发现质膜小泡的数量仅有 3~4 个/ μm^2 ,其中多与质膜表面有联系,未发现跨细胞隧道,偶尔可见细胞间孔。如果脑暴露于高渗环境(3.0 mol/L)或冰冻损伤下,脑血管内皮细胞质膜小泡数量增加。一般认为,细胞内吞分三大类:第一类为受体介导的内吞(receptor-mediated endocytosis, RME),是细胞在网格蛋白(clathrin)参与下内吞结合在质膜受体上的大分子物质过程;第二类是吸附内吞(adsorptive endocytosis, AE),是细胞内吞结合在质膜上的物质分子的过程;第三类为液相内吞(fluid phase endocytosis FPE),是一些与质膜没有亲和力的分子溶于细胞间质而被包裹“饮”入的过程。脑 EC 的液相内吞很低。但是,普通与植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)结合的阳性分子可以通过吸附内吞穿过 EC。少量的特殊蛋白质(例如胰岛素样生长因子、转铁蛋白受体的抗体等)可以通过受体介导的内吞过程完成跨细胞转运^[25]。Broadwell^[26]研究了 BBB 中转运吞噬的过程,当 HRP 暴露于 EC 腔内面时,可以发生细胞内吞;而当脑室灌

注 HRP 时, EC 没有出现 HRP 的内吞。说明 HRP 仅通过 EC 管腔面内吞, EC 内的 HRP 不通过腔外面的胞释,而是被内质网和溶酶体的酶所水解。受体介导的特殊蛋白如转铁蛋白和胰岛素样生长因子的细胞内吞发生在 EC 腔内面上,可能对把血液中的铁和胰岛素样生长因子等转运至脑组织中起着重要作用。

3 星形胶质细胞的作用

脑血管的超微结构研究表明,星形胶质细胞环血管现象是脑血管的一个独有的特点,在 BBB 发育的同时就已经出现^[19]。大量的证据使我们相信,星形胶质细胞对 EC 有极大的影响,对 BBB 的维持有着重要的作用。Svendgaard 等^[27]的实验证实,将非神经组织的血管移植于脑组织中生长,可以获得脑血管 EC 的某些特性,然而,脑血管移植于中胚层组织中,却逐渐失去了脑血管 EC 的特性。Janzer 和 Raft^[28]将纯化的 I 型星形胶质细胞注入到大鼠眼睛的前房或小鸡绒毛膜尿囊,结果发现,移植的星形胶质细胞斑上生长的血管 EC 对伊文氏蓝(evans blue)的通透性明显降低,具有了部分屏障的特性。脑血管 EC 与星形胶质细胞或 C6-神经胶质瘤细胞共同培养,可以刺激 EC 表达 γ -谷氨酰转氨酶、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和碱性磷酸酶。提示星形胶质细胞的存在是脑血管 EC 间 TJ 形成与成熟的条件之一^[29~31]。Rubin 等^[32]将 EC 在有星形胶质细胞存在的培养基中培养,结果生长成为高 TER 值的 EC 斑,如果再与 cAMP 共同培养,可诱生 TER 值高达 625 Ω/cm^2 的 EC 斑,几乎与在体的脑血管的 TER 接近。Wolburg 等^[33]发现,单纯脑血管 EC 在培养条件下逐渐失去 TJ 的特性,而提高培养基中的 cAMP 水平可以恢复 TJ 的特性,cAMP 水平的提高或与星形细胞共同培养可以增加与 TJ 的 PFF 的联系,可以提高 EC 的 TER。

星形胶质细胞对 BBB 的调节和维持作用的机理尚不清楚。若采用胶原隔离技术将牛 EC 与大鼠星形胶质细胞共同培养,结果培养的牛 EC 出现了复杂的 TJ; Tao-cheng 等^[31]观察到,在星形胶质细胞与 EC 共同培养中,二者之间出现了基膜样结构,说明二者之间有溶质因子的扩散,提示星形胶质细胞可能通过基膜来调节 TJ 的诱生。Rubin 等^[32]发现,星形胶质细胞存在或高 cAMP 水平培养时,出现丝状肌动蛋白在 EC 边缘聚集,使得 TJ 的通透性降低。而 Rist 等^[34]用鼠脑血管 EC 在无星形胶质细胞条件或正常 cAMP 水平下培养也可表现出 EC 边缘丝状肌动蛋白的聚集,提示可能还存在其它因子的参与。

通过冷冻蚀刻技术在星形胶质细胞足突与血管之

间发现了一个特别的膜,叫做微粒正交排列(orthogonal arrays of particles, OAP)。正交排列微粒是一些呈长方形排列的微粒,直径在 6~7 nm,足突的膜内微粒有百分之九十以上形成了正交排列微粒^[19]。胶质细胞与血管壁的基膜无直接联系的区域,正交排列微粒的密度明显降低,研究发现正交排列微粒与 K⁺通道以一种相同方式分布在胶质细胞的表面,说明正交排列微粒与 K⁺通道相对应^[35]。K⁺浓度的相对稳定对于脑功能具有非常重要的意义,血液中的 K⁺浓度大约为 5 nmol/L,而脑内大约为 3 mmol/L,由于 BBB 阻止了 K⁺的自由扩散,因此,在神经元活动过程中所增加的细胞外 K⁺浓度的降解存在一个调节回路,有可能通过星形胶质细胞的容积作为缓冲空间来完成。说明 EC 和星形胶质细胞在维持神经元 K⁺浓度的稳定过程中有重要作用。

脑毛细血管周围除星形胶质细胞外,尚有毛细血管周皮细胞、小胶质细胞等,均对血脑屏障有着一定的影响,目前对它们的研究尚少,还无法确定其具有的功能。

4 基膜的结构与功能

在 BBB 中,如果 EC 及其 TJ 作为第一道屏障,那么基膜应该是第二道屏障,同时,基膜对于周围细胞的生长分化也起着一定的调节作用。结构上,基膜主要由 IV 型胶原(type IV collagen)、层连蛋白(laminin)、内肌动蛋白(entactin)、纤维连接蛋白(fibronectin)以及一些糖蛋白等组成,其中 IV 胶原和层连蛋白是构成基膜的主要物质^[36,37]。有人认为,基膜是一种特殊的细胞外间质(extracellular matrix, ECM),可以通过基膜与周围的其它细胞如星形胶质细胞以及血管中层的平滑肌细胞相联系。研究发现,IV 胶原可以直接与层连蛋白连接,也可通过内肌动蛋白与层连蛋白连接,形成聚合体网;同时,纤维连接蛋白可以将基膜与周围组织以及 ECM 相连接。前述在离体条件下星形胶质细胞通过基膜对 EC 进行诱导,其机制可能为基膜的组成元件之间的连接改变了 ECM 与细胞的连接活性或细胞的决定簇所进行的,也可能是基膜的某一元件聚集产生了一个具有特殊结构和表象的低亲和力的细胞连接位点^[36]。Hamann 等^[37]用视屏成像显微镜、激光共聚焦显微镜以及免疫荧光组织化学等手段,对实验性脑缺血再灌注模型中直径小于 100 μm 的脑微血管基膜的 IV 型胶原、层连蛋白、纤维连接蛋白的含量进行了测定。结果发现,缺血组与对照组相比这三种抗原明显减少,提示基膜受到破坏。这种改变的机制有以下几个方面:

① ECM 和基膜属于内皮源性金属蛋白酶和纤溶酶两个不同的降解系统,而层连蛋白和纤维连接蛋白是纤溶酶的降解产物,N 型胶原不直接通过纤溶酶降解,却暴露于其它的蛋白酶中^[38];纤溶酶还可激活明胶酶(gelatinase),使胶原分解^[39];纤溶酶和明胶酶的共同作用导致 ECM 和基膜降解;② 微血管内皮细胞粘附激活导致多形核白细胞进入血管周围间质^[40];Garcia 等^[41]发现,脑缺血后 24 小时有粒细胞的侵入。而粒细胞的激活造成明胶酶和弹性蛋白酶分泌。

5 血脑屏障通透性的调节及其临床意义

外伤、缺血、感染、免疫及理化因素等均可造成 BBB 的损害,导致大分子物质的通透性增高,产生血管源性脑水肿。使用不同的示踪剂研究显示,大分子物质透过 BBB 的途径主要有:(1)EC 间 TJ 的开放;(2)经 EC 质膜小泡转运的增加;(3)穿 EC 隧道的形成。这三种途径中,哪一个是 BBB 开放的最主要的途径尚有争论。Urakawa 等^[42]在大鼠脑局灶性热损伤的研究中将热损伤灶分为坏死区(necrotic zone)、通透区(permeable zone)和反应区(reactive zone)三个区,在坏死区和通透区可以观察到血管外间隙有 HRP 存在,电镜下观察发现,在坏死区 HRP 通过损伤的 EC 和 TJ 的开放进入脑,而在通透区是通过大量的质膜小泡转运。由此推测,在 BBB 损伤中,不同的致伤机制,不同的致伤部位,伤后不同的时期 BBB 通透性的增高可有存在着不同的途径。

血脑屏障通透性的调节对于血管源性脑水肿的治疗以及药物在中枢神经系统的导入有着重要的意义。近来各种化学调节物质与 BBB 通透性的关系尤其引人注目。Olesen^[43]研究了多种调节物质对蛙软脑膜微血管 TER 的影响,发现 5-羟色胺具有剂量依赖性的 TER 的下降,钙阻滞剂异搏定可以阻抑这种结果,钙离子转运载体 RTH1001 和 A23187 可引起类似 5-羟色胺的改变。该实验研究了不同的调制物质与脑微血管 TER 的关系,5-羟色胺、缓激肽、ATP、ADP、AMP、磷脂酶 A、花生四烯酸和白三烯-4C 可降低 TER。最近的研究发现,4 mol/L~10 mol/L 的组胺可引起大鼠脑微血管 TER 下降 75%,但可被甲氧米胍所阻滞(H₂受体拮抗剂),而异丙嗪(H₁受体拮抗剂)则无类似作用^[44];同时,组胺可引起大鼠脑血管 EC 的 Ca²⁺浓度升高^[45],进一步证实了 Ca²⁺对 BBB 通透性调节的中心作用。脑血管 EC 内可能存在一个收缩蛋白激活系统,细胞内 Ca²⁺超载使收缩蛋白激活,引起 TJ 的开放^[46,47]。缓激肽、组胺、ATP 均可导致细胞内储存的 Ca²⁺释放,使细

胞内的游离 Ca^{2+} 浓度升高^[45]。谷氨酸作为中枢神经系统中最重要的兴奋性递质,广泛存在于神经元及神经胶质细胞的代谢库中,由于组织的损伤而释放,可与 NMDA 受体等相连接,使相关的膜离子通道开放,可使 Na^+ 和 Ca^{2+} 内流; Na^+ 内流可引起细胞膜去极化以及电压敏感性 Ca^+ 通道二次开放,导致再次 Ca^{2+} 内流与 Ca^{2+} 释放,引起 Ca^{2+} 超载。而 Ca^{2+} 拮抗剂尼莫地平可使 BBB 的通透性降低^[48]。

在各种脑损伤中,病理性自由基反应也是造成 BBB 功能损害的重要因素。自由基可导致脂质过氧化,自由基形成的瀑布反应造成磷脂膜中不饱和脂肪酸链断裂,最终导致广泛性的生物膜的损害,使 BBB 的功能受到影响。而在动物的缺氧和外伤模型中,抗氧化剂 6 氨基类固醇有一定的维持 BBB 功能的作用^[49]。

参考文献

- 1 Brightman MW, Rees TS. Junctions between intimately apposed cell membranes to horseradish peroxidase. An ultrastructural study. *Cell Tiss Res*, 1969, **198**: 65~77.
- 2 Nagy Z, Peterz H, Hiittner J. Fracture faces of cell junctions in cerebral endothelium during normal and hyperosmotic conditions. *Lab Invest*, 1984, **50**: 313~322.
- 3 Diamond JE. The epithelial junction: bridge, gap and fence. *Physiologist*, 1977, **20**: 10~18.
- 4 Pedro PS, Bechara K. On tight-junction structure. *Cell*, 1982, **28**: 441~450.
- 5 Butt AM, Jones HC, Abbott NJ. Electrical resistance across the blood brain barrier in anaesthetized rats; a development study. *J Physiol*, 1990, **429**: 47~62.
- 6 Schneeberger EE, Lynch RD. Structure, function and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol*, 1992, **262**: L647~L661.
- 7 Stevenson BR, Goodenough DA. Zonulae occludentes in junctional complex enriched fractions from mouse liver: Preliminary morphological and biochemical characterization. *Cell Biol*, 1984, **98**: 1 209~ 221.
- 8 Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, et al. Identification of ZO-1; A high molecular weight polypeptide associated with the tight junction [zonula occludens] in a variety of epithelia. *J Cell Biol*, 1986, **103**: 755~766.
- 9 Citi S, Sabanay H, Jakes R, et al. Cingulin, a new peripheral component of tight junction. *Nature*, 1988, **333**: 272~276.
- 10 Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatiral D. Identification of a 160 kDa polypeptide that binds to tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 3 460~

- 464.
- 11 Zhong T, Saitch T, Minase T, et al. Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *Cell Biol*, 1993, **120**: 477~483.
- 12 Itoh M, Yonemura S, Nagafuchi A, et al. A 220 kDa undercoat-constitutive protein its specific localization at cadherinbased cell-cell adhesion sites. *J Cell Biol*, 1991, **115**: 449~462.
- 13 Itoh M, Nagafuchi S, Yonemura S, et al. The 220 kDa protein in localizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells; cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol*, 1993, **121**: 4 491~502.
- 14 Geiger B, Ayalon O. Cadherins. *Ann Rev Cell Biol*, 1992, **8**: 307~332.
- 15 Gumbiner B, Stevenson B, Grimaldi A. Role of the cell adhesion molecular uomrulin in formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol*, 1988, **107**: 1 575~587.
- 16 Takeichi M. Cadherins; a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Ann Rev Biochem*, 1990, **59**: 237~252.
- 17 Romero IA, Chan MWK, Rist RJ. The permeability of [¹⁴C] sucrose through an in vitro blood-brain barrier model, the EBE4 cell line. *J Physiol*, 1994, **480**: 8.
- 18 Baldo MS, Gonzalez ML, Cereijido M, et al. Assembly and sealing of tight junctions; possible participation of G-proteins, phospholipase C, protein kinase C and calmodulin. *J Mem Biol*, 1991, **122**: 193~202.
- 19 Werener R, Hartwig W. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci*, 1990, **13**: 174~178.
- 20 Derietxel R, Krause D. Molecular anatomy of the blood-brain barrier as define by immunocytochemistry. *Intern Rev Cytol*, 1991, **127**: 57~109.
- 21 Manuel M, Sanchez del Pino, Peterson DR, et al. Biochemical discrimination between luminal and abluminal enzyme and transport activities of the blood-brain barrier. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 14 897~912.
- 22 Simionescu M, Ghitsecu L, Fixman A, et al. How plasma macromolecules cross the endothelium. *News Physiol Sci*, 1987, **2**: 97~100.
- 23 Bundgaard M, Frokjaer JJ, Grone C. Endothelial plasmalemmal vesicles as elements in a system of branching invaginations from the cell surface. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 6 439~442.
- 24 Nagy Z, Pettigrew KD, Meisrlman S, et al. Cerebral

- vessels eryofixed after hyperosmosis or cold injury in normothermic and hypothermic frogs. *Brain Res*, 1988, **440**: 315~327.
- 25 Friden PM, Walus LR, Watsen P, et al. Blood-brain barrier penteration and in vivo activity of an NGF conjugat. *Science*, 1993, **259**: 373~377.
- 26 Broadwell RD. Transcytosis of macromolecules through the blood-brain barrier; a cell biological perspective and critical appraaisal. *Act Neuropathol*, 1989, **79**: 117~128.
- 27 Svendgaard NA, et al. Axonal degeneration associated with a defective blood-brain barrier in cerebral implants. *Nature*, 1975, **25**: 334~337.
- 28 Janzer RC, Raft MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cell. *Nature*, 1987, **325**: 253~257.
- 29 Tonsch W, Bauer HC. Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. *Brain Res*, 1991, **539**: 247~253.
- 30 Meyer J, Tauh J, Galla HJ. The susceptibility of cerebral endothelial cells to astroglial induction of blood-brain barrier enzymes depends on their proliferative state. *J Neurochem*, 1991, **57**: 1 971~977.
- 31 Tao-cheng JH, Nagy Z, Brightman MW. Tight junction of brain endothelium in vitro and enhanced by astroglia. *J Neurosci*, 1987, **7**: 3 293~299.
- 32 Rubin LI, Hall DE, Bard F. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol*, 1991, **115**: 1 725~735.
- 33 Wolburg H, Neuhaus U, Risau W. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci*, 1994, **107**: 1 347~357.
- 34 Rist RJ, Romero IA, Abbott NJ. The effect of a cAMP agonist and astrocyte-conditioned medium on the F-actin cytoskeleton in cultured primary and immortalized rat brain capillary endothelial cells. *J Physiol*, 1994, **480**: 8~9.
- 35 Newman EA. Membrane physiology of retinal glial [muller] cells. *J Neurosci*, 1985, **5**: 2 225~240.
- 36 Yurchenco PD, Schittny JC. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J*, 1990, **4**: 1 577~590.
- 37 Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, et al. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*, 1995, **26**: 2 120~126.
- 38 Barnathan ES, Kuo A, Caines DB, et al. Tissue-type plasminogen activator binding to human endothelial cells. *J Biol Chem*, 1988, **263**: 7 792~799.
- 39 Wong AP, Cortez SL, Baricos WH. Role of plasmin and gelatnase in extracellular matrix degradation by cultured rat mesangial cell. *Am J Physiol*, 1992, **263**: F1 112~118.
- 40 Hoover RL, Briggs RT, Karnovsky MJ. The adhesive interaction between polymorphonuclear leukocytes and endothelial cells in vitro. *Cell*, 1978, **14**: 423~428.
- 41 Garcia JH, Yoshida Y, Chopp M. Progression from ischemic injury to infarct follwing middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol*, 1993, **142**: 623~635.
- 42 Urakawa M, Yamaguchi K, Matsuda T. Blood-brain barrier disturbance following localized hyperthermia in rats. *Intern J Hyperther*, 1995, **11**: 709~718.
- 43 Olesen SP. A calcium-dependent reversible permeability increase in microvessels in frog brain, induced by serotonin. *J Physiol*, 1985, **361**: 103~113.
- 44 Butt AM, Jones HC. Effect of histamine and antagonists on electrical resistance across the blood-brain barrier in rat brain-surface microvessels. *Brain Res*, 1992, **569**: 100~105.
- 45 Revvest PA, Abbott NJ, Gillesp JI. Receptor-mediated changes in intracellular [Ca²⁺] in cultured rat brain endothelial cells. *Brain Res*, 1991, **549**: 159~161.
- 46 Herman IM, Pollard TD, Wong AJ. Contractile proteins in endothelial cells. *Ann NY Acad Sci*, 1982, **401**: 50~60.
- 47 Bundaard M. Tubular invaginations in cerebral endothelium and their relation to smooth-surfaced cisternae in hagfish (*Myxine glutinosa*). *Cell Tiss Res*, 1987, **249**: 359~365.
- 48 徐如祥, 易声禹, 等. 脑损伤早期胶体金示踪法血脑屏障通透性定量研究. *中华实验外科杂志*, 1990, **7**: 119.
- 49 Smith SL, Andrus PK, ZHANG JR, et al. Direct measurement of hydroxyl radicals, lipid peroxidation, and blood-brain barrier disruption following unilateral cortical impact head injury in the rat. *J Neurotrauma*, 1994, **11**: 393~404.

(1997-03-24 收到)