

·综述·

体外血脑屏障模型的研究及其应用

张海妮¹, 张瑞丽², 王千秋¹

1. 中国医学科学院皮肤病医院(中国医学科学院皮肤病研究所), 江苏 南京 210042
2. 南京医科大学第二附属医院, 江苏 南京 210003

摘要:血脑屏障(BBB)是一种动态的高度紧密的组织结构,严格地调控大脑与外周血的物质交换。BBB结构破坏与多种中枢神经系统疾病相关,构建适合的BBB模型有利于中枢神经系统疾病的研究及药物筛选。该文就体外BBB模型的研究进展进行综述,主要讨论了目前应用最广泛的Transwell模型和最新的微流控芯片模型的构建方法及其特点。目前构建体外BBB最常用的模型是Transwell模型,能直接检测BBB的跨内皮电阻和渗透性。BBB微流控芯片通过微灌注系统模拟了血液流动,更符合器官组织的生理状态,更适用于构建疾病模型、药物筛选等,是更有发展前景的体外模型。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2021, 48(3): 303-306]

关键词:血脑屏障;体外模型;器官芯片;微流控芯片

中图分类号:R741.02

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2021.03.018

Research and application of *in vitro* blood-brain barrier model

ZHANG Hai-Ni¹, ZHANG Rui-Li², WANG Qian-Qiu¹

1. Hospital for Skin Diseases (Institute of Dermatology), Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical Colleges, Nanjing, Jiangsu 210042, China

2. The Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210003, China

Corresponding author: WANG Qian-Qiu, Email: wangqianqiu@126.com

Abstract: The blood-brain barrier (BBB) is a dynamic and highly compact tissue structure that strictly regulates the exchange of substances between the brain and peripheral blood, and the destruction of BBB is associated with a variety of central nervous system diseases. The construction of a suitable BBB model is beneficial to the research on central nervous system diseases and drug screening. In this paper, we review the research progress of *in vitro* BBB model, and mainly discuss the construction methods and characteristics of the most widely used Transwell model and the latest microfluidic chip model. The most commonly used model is the Transwell model, which can directly determine the transendothelial resistance and permeability of BBB. While, the microfluidic chip model is a more promising *in vitro* model because the BBB microfluidic chip simulates the blood flow through the micro perfusion system, which is more in line with the physiological state of organs and tissues, and is more suitable for the construction of disease model, drug screening, and so on.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2021, 48(3): 303-306]

Keywords: blood-brain barrier; vitro model; organ chip; micro fluidic chip

1 血脑屏障的生理结构

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)是一个特殊的多层膜结构,由脑微血管内皮细胞层、基底膜、星型胶质细胞

的足突等组成,是一个有高度选择性、半渗透性的膜。

BBB的紧密结构能阻止有害物质进入大脑,也能选择性地允许外周血中的营养物质进入大脑,对维持脑内微环境有

收稿日期:2020-11-18;修回日期:2021-01-04

作者简介:张海妮(1995-),女,研究生,硕士学位。专业方向梅毒致病机制与免疫方面。Email:455313341@qq.com。

通信作者:王千秋(1963-),男,研究员,博士学位,博士生导师。主要从事梅毒致病机制与免疫方面的研究。Email:wangqianqiu@126.com。

重要作用^[1]。多种中枢神经系统疾病与 BBB 结构破坏有关,但 BBB 结构致密不利于药物进入大脑,对疾病治疗造成困难。因此,构建符合人体生理结构的体外 BBB 模型,可为中枢神经系统疾病研究、药物研发奠定基础^[2-3]。

脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMEC) 与神经元、星形胶质细胞、周细胞等组成的神经-血管单元 (neurovascular unit, NVU), 是 BBB 的基本结构和功能单位。BMEC 及其基膜是 BBB 的主要成分。BMEC 是连续的无孔的内皮细胞,细胞内表达的多种紧密连接蛋白是维持 BBB 紧密结构的关键。BMEC 通过胞吞作用转运物质的能力有限,维持了 BBB 的屏障功能^[1]。基底膜分为脑微血管基膜和星形胶质细胞足突胶质界膜两层,在 BBB 中起着细胞支持和信号转导的重要作用^[1]。星形胶质细胞通过足突与 BMEC 的外表面紧密相连,覆盖了脑血管表面约 99% 的区域。周细胞与 BMEC 的比例约为 3:1,通过其长突起嵌在脑微血管内皮细胞的基底膜中,在 BBB 的形成与成熟中发挥重要作用^[4]。星形胶质细胞与周细胞共同参与调节 BBB 的渗透性^[5-6],并通过调节局部血流量,调控 NVU 的功能,维持神经元正常的结构和功能^[4,7]。星胶质细胞、周细胞还可以与 BMEC 相互作用,影响 BMEC 内基因的表达,从而调节 BBB 完整性^[8-9]。

2 评价体外血脑屏障的方法

目前,对体内 BBB 的相关特性了解仍不全面,因此很难全面地描述一个理想的体外血脑屏障模型的结构和功能特性。高度的紧密连接性是 BBB 最主要的特征,主要通过测量跨内皮电阻 (trans-endothelial electrical resistance, TEER) 来评估。不同 BBB 模型的 TEER 值不同,不仅与模型的紧密连接有关,还与测量的设备、测量时的温度等多种因素有关^[10]。因此, BBB 的紧密连接性不能只看 TEER 数值。BBB 的紧密连接性与 BMEC 间紧密连接复合物的形成有关,连接复合物包括紧密连接和黏附连接。紧密连接中紧密连接蛋白 (occludin, claudins-5) 和细胞支架蛋白 (zonula occludens-1, ZO-1) 等对紧密连接起调节作用。黏附连接中黏附蛋白血管内皮钙黏蛋白 (VE-cadherin)、血小板内皮细胞黏附分子 1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1) 等与细胞间相互作用相关^[11]。检测这些蛋白的表达常用于评价 BBB 的紧密连接性^[12]。BMEC 内特异性的碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、 γ -谷氨酸转氨酶 (γ -l-glutamate transpeptidase, γ -GT) 等蛋白对维持内皮细胞-紧密连接功能有重要作用^[13]。透射电子显微镜能直接观察 BBB 的紧密连接结构^[14],也可用于追踪纳米颗粒跨 BBB 迁移^[15],有利于评价 BBB 模型的紧密连接特性。通过测定异硫氰酸-葡聚糖 (FITC-dextran)、荧光黄 (fluorescent yellow, LY)、荧光素钠 (sodium fluorescein, Na-F)、葡萄糖或甘露醇^[16]等亲水性示踪分子跨 BMEC 迁移,评价 BBB 细胞旁通透性。细胞跨内皮细

胞迁移用于评价 BBB 的紧密连接和完整性^[17]。

BMEC 内外排转运体 ABC 转运体 (ATP-binding cassette transport, ABC) 和可溶性载体 (solute carriers, SLCs) 的表达、正确的定位和功能与 BBB 的渗透性相关。ABC 转运体包括 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)、Mrp、抗乳腺癌蛋白 (breast cancer resistant protein, BCRP) 等。P-gp 将 BMEC 内物质泵出到血液,它在 BMEC 底部的累积与 BBB 的泵出功能密切相关。SLCs 包括葡萄糖转运体-1 (glucose transporter-1, Glut-1)、L 型氨基酸转运体 (L-type amino acid transporter 1, LAT-1)、单羧酸转运体-1 (mono-carboxylic transporter 1, MCT-1)。检测 SLCs、ABC 转运体的表达可用于评价 BBB 模型的渗透性和药物代谢、筛选等方面的研究。

3 静态 BBB 模型

静态 BBB 模型包括 Transwell 模型、脑切片模型、3D 模型 (three dimensional, 3D) 等。脑切片模型是将 BBB 培养在切片上,有血脑屏障所有的细胞及完整的组织结构。脑切片模型是研究生理学和药理学研究的绝佳工具,也有利于研究不同的生理和病理条件 BBB 结构、功能的改变^[18]。静态 3D 模型是利用 3D 基质^[15]或血脑屏障球培养平台^[19],构建 BBB 模型^[15]或血脑屏障球^[19]。静态 3D 模型为细胞提供结构支持和适宜的细胞外基质,模拟 BBB 的立体结构,有利于维持细胞特性^[15]、更好地模拟 BBB 特性和快速筛选中枢神经系统药物^[19]。但 3D 模型没有血管结构,难以检测 TEER,实际利用困难。

目前构建 BBB 最常见、最方便的模型是 Transwell 模型。Transwell 模型是将一种或多种细胞培养在 Transwell 微孔膜两侧模拟 BBB 结构,可直接测量 BBB 的 TEER 值和渗透性。Transwell 结构的半透性微孔膜允许小分子物质跨膜交换、阻止细胞跨膜迁移,是构建 BBB 的理想结构。根据 Transwell 中培养的细胞种类,可将 BBB 模型分为单细胞模型、两细胞、三细胞和四细胞共培养模型等。单细胞模型是将 BMEC 培养在 Transwell 小室的上侧,是最简单的体外 BBB 模型,但 BMEC 缺乏与其他类型细胞间的相互作用,不能完全模拟 BBB 的特性和功能。两细胞共培养分为 BMEC-星形胶质细胞接触性培养^[20]、BMEC-星形胶质细胞非接触性培养^[21]和 BMEC-周细胞非接触性培养^[17]。其中 BMEC-星形胶质细胞接触培养、BMEC-周细胞非接触性培养更符合 BBB 生理结构。BMEC 和星形胶质细胞共培养在 Transwell 模型的上室,构建的 BBB 模型能更好地提高血脑屏障通透性^[22]。三细胞共培养可分为 BMEC-星形胶质细胞-周细胞共培养、BMEC-星形胶质细胞-神经元共培养模型。BMEC 培养在 Transwell 上室,星形胶质细胞和周细胞的混合培养在 Transwell 模型微孔膜的下侧。这种模型更符合生理结构,有利于细胞间直接接触,交换细胞生长发育所需的生

长因子^[22]。四细胞共培养是在 Transwell 模型上培养 BMEC-星形胶质细胞-周细胞-神经元,构建简易的 NVU。

研究表明,血液流动产生的流体剪切力在增加内皮细胞生存时间、影响细胞表型和阻止细胞分化、提高内皮细胞间紧密连接和 BBB 转运力等方面至关重要^[23]。静态模型对 LY、Na-F 等因子渗透性高,BMEC 内 P-gp、外排泵转运蛋白的低表达,可能与静态模型不能模拟体内的血液流动环境有关,因此静态模型无法完全模拟体内血脑屏障的结构、功能。

4 动态 BBB 模型

器官芯片是在微流控芯片上培养细胞,以期在芯片上构建结构功能与人体相似的器官组织。微流控芯片通过持续灌注装置为细胞培养持续灌注提供了条件。BBB 芯片通过电渗透率测定法^[24]或直接测量 TEER^[25],方便检测血脑屏障的紧密连接性,能实时监测血脑屏障的功能。

BBB 芯片分为 2D(two dimensional, 2D)芯片和 3D 芯片。Griep 利用 Transwell 的聚二甲基硅烷(polydimethylsilane, PDMS)膜,将 2 个微流体室隔开,将内皮细胞与其他细胞分别培养在膜的两侧形成,构建了最简单的 2D 芯片。该芯片能实时监测血脑屏障的 TEER 值,TEER 值明显高于 Transwell 模型^[25]。Jacquelyn 等^[26]利用 PDMS 膜将芯片分为上下 2 个腔,上腔接种内皮细胞形成血管腔,下腔接种星形胶质细胞、周细胞和神经元形成神经腔,并通过微灌注系统,分别灌注模拟血液和脑脊液流动,避免了血管腔内培养基对神经腔内细胞的影响。Anna 等^[27]研发了商品化的 μ HuB 芯片,将 BMECs 培养在一个包含中央空心圆柱胶原蛋白凝胶内腔,并通过内腔流动介质,构建了简易的 3D 血脑屏障的模型。该芯片验证了周细胞、星形胶质细胞在构建 BBB 时的排列形态及其对 BBB 通透性的影响,观察到细胞间的相互作用及物质跨内皮细胞迁移的速率。这种商品化的芯片提供了简易构建 3D 血脑屏障模型的平台。Seokyoung 等^[28]先灌注内皮细胞形成血管后播植神经细胞,模拟内血脑屏障的发育,构建了一个脑微血管与神经元相互作用的网络。提出血管腔、神经腔分开灌注,能增加血管网与星形胶质细胞的接触面积,能更好地表现出 BBB 特征。芯片能展现出 BBB 完整的形态学特征,并展现了构成 BBB 细胞间的相互作用^[29]。3D 芯片虽然能构建血脑屏障的复杂结构,但不能直接测量内皮细胞的 TEER,而且建模时间较长难以广泛应用。简化构建的 3D 血脑屏障芯片,有利于提高 BBB 芯片的应用。

5 微流控芯片的应用与展望

目前已经用 BBB 芯片检测了肿瘤坏死因子 α 、脂多糖等炎症因子会损伤血脑屏障紧密连接,增加 BBB 的通透性,并改变内皮细胞的代谢组学特征^[25-26]。另外,炎症

刺激下微流控芯片模型与 Transwell 模型中内皮细胞释放的炎症因子的种类、数量不尽相同,提示微流控芯片可能更适用于神经炎症等方面的研究^[26]。血脑屏障芯片验证了不同抗体跨内皮细胞迁移存在敏感性差异^[30],还验证了物质的细胞毒性和细胞损伤性,并定量分析了受体介导的物质穿胞作用和脑内皮特异性穿透能力。器官芯片可以作为候选药物载体的体外平台,用于评估各种脑靶向药物的穿透性和细胞毒性^[31],简化药物开发的流程,加速药物研发。

BBB 芯片还可用于研发中枢神经系统的疾病模型,基于微流控芯片技术研发的新生儿血脑屏障体外模型,为新生儿神经病理学的提供研究方法^[32]。阿尔茨海默病体外模型,表现出 BBB 通透性增加、血管内皮细胞淀粉样蛋白沉积等疾病关键特点,为药物筛选提供了良好的模型^[33]。另外,还能构建人体内多个系统相互连接的模型,肠-脑-血脑屏障的芯片可以应用于微生物-肠-脑轴在神经退行性变中的研究^[35]。

微流控芯片能构建更符合人体 BBB 血脑屏障芯片更符合体内血脑屏障结构的特点,解决了当前细胞和动物模型的局限性,能体外模拟人类病理生理学,为研究中枢神经系统的生理病理机制及药物通透性筛选提供方便^[36]。微流控芯片在构建疾病模型、药物筛选等方面有优势,是更有发展前景的 BBB 模型。

参 考 文 献

- [1] SERLIN Y, SHELEF I, KNYAZER B, et al. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier[J]. Semin Cell Dev Biol, 2015, 38: 2-6.
- [2] GERHARTL A, PRACSER N, VLADETIC A, et al. The pivotal role of micro-environmental cells in a human blood-brain barrier in vitro model of cerebral ischemia: functional and transcriptomic analysis[J]. Fluids Barriers CNS, 2020, 17(1): 19.
- [3] XU LM, DAN M, SHAO AL, et al. Silver nanoparticles induce tight junction disruption and astrocyte neurotoxicity in a rat blood-brain barrier primary triple coculture model[J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10: 6105-6118.
- [4] AGO T. [Why are pericytes important for brain functions?][J]. Rinsho Shinkeigaku, 2019, 59(11): 707-715.
- [5] MATHIJSSEN TM, LEHRE KP, DANBOLT NC, et al. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction [J]. Glia, 2010, 58(9): 1094-1103.
- [6] ARMULIK A, GENOVÉ G, MÄE M, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier[J]. Nature, 2010, 468(7323): 557-561.
- [7] TAKANO T, TIAN GF, PENG WG, et al. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow[J]. Nat Neurosci, 2006, 9(2): 260-267.
- [8] WILLS CL. Imaging in vivo astrocyte/endothelial cell interactions at the blood-brain barrier[J]. Methods Mol Biol, 2012, 814:

- 515-529.
- [9] DOHGU S, TAKATA F, YAMAUCHI A, et al. Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production [J]. *Brain Res*, 2005, 1038(2): 208-215.
 - [10] SRINIVASAN B, KOLLI AR, ESCH MB, et al. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems[J]. *J Lab Autom*, 2015, 20(2): 107-126.
 - [11] FU BM. Transport across the blood-brain barrier[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1097: 235-259.
 - [12] ABBOTT NJ, PATABENDIGE AA, DOLMAN DE, et al. Structure and function of the blood - brain barrier[J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37(1): 13-25.
 - [13] LIU LB, LI XD, ZHANG XZ, et al. Biomanufacturing of a novel in vitro biomimetic blood-brain barrier model[J]. *Biofabrication*, 2020, 12(3): 035008.
 - [14] YE D, DAWSON KA, LYNCH I. A TEM protocol for quality assurance of in vitro cellular barrier models and its application to the assessment of nanoparticle transport mechanisms across barriers[J]. *Analyst*, 2015, 140(1): 83-97.
 - [15] SREEKANTHREDDY P, GROMNICOVA R, DAVIES H, et al. A three-dimensional model of the human blood-brain barrier to analyse the transport of nanoparticles and astrocyte/endothelial interactions[J]. *F1000Res*, 2015, 4: 1279.
 - [16] AL-AHMAD AJ. Comparative study of expression and activity of glucose transporters between stem cell-derived brain microvascular endothelial cells and hCMEC/D3 cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2017, 313(4): C421-C429.
 - [17] VANDENHAUTE E, DROLEZ A, SEVIN E, et al. Adapting coculture in vitro models of the blood-brain barrier for use in cancer research: maintaining an appropriate endothelial monolayer for the assessment of transendothelial migration[J]. *Lab Invest*, 2016, 96(5): 588-598.
 - [18] MORIN-BUREAU M, DE BOCK F, LEMER-NATOLI M. Organotypic brain slices: a model to study the neurovascular unit micro-environment in epilepsies[J]. *Fluids Barriers CNS*, 2013, 10(1): 11.
 - [19] CHO CF, WOLFE JM, FADZEN CM, et al. Blood-brain-barrier spheroids as an in vitro screening platform for brain-penetrating agents[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15623.
 - [20] KULCZAR C, LUBIN KE, LEFEBVRE S, et al. Development of a direct contact astrocyte-human cerebral microvessel endothelial cells blood-brain barrier coculture model[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2017, 69(12): 1684-1696.
 - [21] LI Y, SUN XY, LIU HF, et al. Development of human in vitro brain-blood barrier model from induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells to predict the in vivo permeability of drugs[J]. *Neurosci Bull*, 2019, 35(6): 996-1010.
 - [22] STONE NL, ENGLAND TJ, O'SULLIVAN SE. A novel transwell blood brain barrier model using primary human cells[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 230.
 - [23] HENRY OYF, VILLENAVE R, CRONCE MJ, et al. Organs-on-chips with integrated electrodes for trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of human epithelial barrier function[J]. *Lab Chip*, 2017, 17(13): 2264-2271.
 - [24] SEO S, KIM H, SUNG JH, et al. Microphysiological systems for recapitulating physiology and function of blood-brain barrier[J]. *Biomaterials*, 2020, 232: 119732.
 - [25] GRIEP LM, WOLLBERS F, DE WAGENAAR B, et al. BBB on chip: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function[J]. *Biomed Microdevices*, 2013, 15(1): 145-150.
 - [26] BROWN JA, CODREANU SG, SHI MJ, et al. Metabolic consequences of inflammatory disruption of the blood-brain barrier in an organ-on-chip model of the human neurovascular unit[J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 306.
 - [27] BROWN TD, NOWAK M, BAYLES AV, et al. A microfluidic model of human brain (μ HuB) for assessment of blood brain barrier[J]. *Bioeng Transl Med*, 2019, 4(2): e10126.
 - [28] LEE SR, HYUNG S, BANG S, et al. Modeling neural circuit, blood-brain barrier, and myelination on a microfluidic 96 well plate[J]. *Biofabrication*, 2019, 11(3): 035013.
 - [29] LEE S, CHUNG M, LEE SR, et al. 3D brain angiogenesis model to reconstitute functional human blood-brain barrier in vitro[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2020, 117(3): 748-762.
 - [30] WEVERS NR, KASI DG, GRAY T, et al. A perfused human blood-brain barrier on-a-chip for high-throughput assessment of barrier function and antibody transport[J]. *Fluids Barriers CNS*, 2018, 15(1): 23.
 - [31] CHUNG B, KIM J, NAM J, et al. Evaluation of cell-penetrating peptides using microfluidic in vitro 3D brain endothelial barrier [J]. *Macromol Biosci*, 2020, 20(6): e1900425.
 - [32] DEOSARKAR SP, PRABHAKARPANDIAN B, WANG B, et al. A novel dynamic neonatal blood-brain barrier on a chip[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142725.
 - [33] SHIN Y, CHOI SH, KIM E, et al. Blood-brain barrier dysfunction in a 3D in vitro model of Alzheimer's disease[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, 6(20): 1900962.
 - [34] TEJAVIBULYA N, SIA SK. Personalized disease models on a chip[J]. *Cell Syst*, 2016, 3(5): 416-418.
 - [35] RAIMONDI I, IZZO L, TUNESI M, et al. Organ-on-a-chip in vitro models of the brain and the blood-brain barrier and their value to study the microbiota-gut-brain axis in neurodegeneration[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 7: 435.
 - [36] LINVILLE RM, DESTEFANO JG, SKLAR MB, et al. Modeling hyperosmotic blood-brain barrier opening within human tissue-engineered in vitro brain microvessels[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2020, 40(7): 1517-1532.
 - [37] MOYA ML, TRIPLETT M, SIMON M, et al. A reconfigurable in vitro model for studying the blood-brain barrier[J]. *Ann Biomed Eng*, 2020, 48(2): 780-793.