

DOI: 10.13376/j.cblls/2018039

文章编号: 1004-0374(2018)03-0310-09

# 血脑屏障体外模型研发

沙保勇<sup>1</sup>, 刘洁<sup>1</sup>, 景晓红<sup>1\*</sup>, 高巍<sup>2\*</sup>

(1 西安医学院基础医学部, 西安 710021; 2 西安交通大学第一附属医院麻醉科, 西安 710061)

**摘要:** 血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 是介于血液和脑组织间的一种动态界面, 严格调控血-脑间的物质运输, 为神经功能的实现提供稳定的内环境。许多药物因无法通过血脑屏障达到有效剂量而被淘汰。现在, 越来越多的研究转向血脑屏障体外模型的研制。现从血脑屏障的结构、制备血脑屏障体外模型的预期目标、血脑屏障体外模型构成组分的来源以及血脑屏障体外模型装置等方面, 综述了现有静态及动态培养 BBB 体外模型的发展及优缺点, 以期 BBB 体外模型的应用提供一定理论依据。

**关键词:** 血脑屏障; 紧密连接; 体外模型; 微流控

**中图分类号:** R318.5 **文献标志码:** A

## The development of blood-brain barrier *in vitro* model

SHA Bao-Yong<sup>1</sup>, LIU Jie<sup>1</sup>, JING Xiao-Hong<sup>1\*</sup>, GAO Wei<sup>2\*</sup>

(1 Institute of Basic Medical Science, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China;

2 Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

**Abstract:** The blood-brain barrier (BBB) can be characterized as a dynamic barrier in the interface between the blood of the brain microvasculature and the brain tissue, which maintains a homeostasis that allows neurons to function properly by tightly controlling the passage of materials transport. Many therapeutic drugs with low permeability have been eliminated because they fail to cross BBB. Nowadays, more and more researches focus on the development of the *in vitro* BBB models. Herein, we provide a detailed review on BBB structure, the expected target of *in vitro* model, the components used to form the BBB model, and the advantages and disadvantages of *in vitro* model device, thereby intending to contribute to a stronger theoretical basis for the application of *in vitro* BBB model.

**Key words:** blood-brain barrier; tight junctions; *in vitro* model; microfluidic

血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 是存在于中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 和血液循环系统之间的一种动态界面, 其通过严格准确调控神经元功能所需的各种物质的运输, 维持 CNS 内环境的稳定<sup>[1]</sup>。BBB 通过紧密连接 (tight junctions, TJs) 等结构为 CNS 构建了完整的生理性屏障, 在保护 CNS 免受各种有害物质损伤的同时, 也成为帕金森病、脑卒中等 CNS 相关疾病治疗药物不得不面对的壁垒<sup>[2]</sup>。CNS 疾病治疗药物要经过 12~16 年的时间才能走向市场, 很多药物在研发过程中, 因无法通过 BBB 渗透入脑组织达到有效剂量, 而被淘汰<sup>[2]</sup>。随着对 BBB 结构研究的不断深入, 以

及各种新型制造技术的涌现, BBB 体外模型的研发和应用越来越受到关注, 低成本、高通量筛选、高仿真、高重现率的 BBB 体外模型的制备, 对探究 BBB 的正常生理功能、解释疾病状态下 BBB 功能紊乱的机制、缩短 CNS 药物研发周期、保障药物

收稿日期: 2017-09-11; 修回日期: 2017-10-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81771485); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2017JM8097); 陕西省优势学科建设经费(陕教位2014-3-1001); 西安医学院国家基金培育项目(2017GJFY23)

\*通信作者: E-mail: 121915839@qq.com (景晓红); gaoweibaoyong2012@gmail.com (高巍)

效果等尤为重要。基于此, 本文综述了现有 BBB 体外模型的发展及优缺点, 以期为 BBB 体外模型的应用提供一定理论依据。

## 1 BBB的组成及功能

BBB 主要由脑微管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMECs)、周细胞、星形胶质细胞终足、基膜等结构组成, 从 BBB 的结构上看, 临近的 BMECs 通过建立 TJs 形成 BBB 的雏形, 星形胶质细胞环绕在 BMECs 细胞的外侧, 周细胞嵌在 BMECs 和星形胶质细胞之间<sup>[3]</sup>。BMECs 既有外周内皮细胞, 又有上皮细胞的特性, 相邻 BMECs 间存在连续的 TJs, 细胞具有低胞吞及胞转活性等<sup>[4]</sup>。周细胞对脑毛细血管壁的形成、脑微管和 BBB 结构的稳定、毛细血管直径和脑血流量的调控具有重要的作用<sup>[5-6]</sup>。星形胶质细胞 (astrocytes) 通过细胞终足几乎包裹覆盖整个脑毛细血管<sup>[4-5]</sup>。BMECs、周细胞、星形胶质细胞连续分泌细胞外基质蛋白, 构成厚 40~50 nm 的基膜<sup>[5]</sup>。

为了实现 BBB 的功能, BMECs、周细胞和星形胶质细胞需相互作用。研究表明, 周细胞与 BMECs 共用基膜, 通过神经钙黏素等跨膜连接蛋白彼此结合, 实现离子、代谢物、第二信使等物质交换<sup>[7]</sup>, 如 BMECs 分泌的血小板衍生生长因子通过基膜形成密度梯度, 调控周细胞的增殖和迁移<sup>[5]</sup>。此外, 在脑管内皮细胞分化的过程中, 星形胶质细胞通过基膜与 BMECs 相互作用, 共同调控关键蛋白的表达<sup>[4]</sup>。疾病状态下, 星形胶质细胞分泌的载脂蛋白 E 能与周细胞表面的低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 相互作用, 激活促炎性信号通路, 导致 BMECs 间 TJs 蛋白和基膜的降解, 引发 BBB 功能紊乱<sup>[8]</sup>。

## 2 BBB体外模型的发展目标

BBB 能保证 CNS 内环境的稳定, 在严格控制进出脑组织物质的同时, 也成为制约 CNS 疾病药物发展的壁垒。动物模型 (如通过原位脑灌注) 常被用于 CNS 药物的研发, 但因为种属差异大、实验费用高和药效预测能力差等原因, 无法实现真实模拟人类反应的目的<sup>[9]</sup>。随着对维持、调控 BBB 和 CNS 内环境稳定机制的深入研究, 越来越多的科研人员转向了 BBB 体外模型的研制和应用<sup>[2]</sup>。高保真 BBB 体外模型的发展, 一方面能提高 CNS 候选药物早期药效 (向脑组织渗透的能力等) 筛查

的准确性, 加速神经治疗药物的研发过程, 另一方面能减少, 甚至替代动物实验, 保障动物福利<sup>[2,10]</sup>。

体外模型旨在离体可控环境下, 评估特定实验药物的生理性和病理性反应。比较理想的 BBB 体外模型应该能在各种条件下, 准确再现脑血管所处的复杂微环境, 包括: (1) 所用脑管内皮细胞应能展现和形成成熟 BBB 时的表型, 如转运蛋白、代谢酶等表达和分布应该具有非对称性<sup>[5]</sup>; (2) 相邻的脑管内皮细胞间能形成 TJs 等结构, 对物质有极严格的选择通透性<sup>[7]</sup>; (3) 能真实再现生理或病理状态下细胞间的相互作用<sup>[1]</sup>; (4) 能外加调控 BBB 功能的各种生物、机械等因素, 如生长因子、剪切应力等<sup>[11]</sup>; (5) 能比较方便地实现正常模型向阿尔茨海默症、癫痫等疾病模型的转化<sup>[1]</sup>; (6) 具有易制备、高通量筛选、高重现率等优点。

## 3 BBB体外模型构成组分的来源

要制备比较理想的 BBB 体外模型, 首先应考虑制备 BBB 体外模型所需材料来源的问题。磷脂类似物/脂质可用于构建固化人工膜色谱模型和平行人工膜渗透模型, 实现对 CNS 药物渗透性及药物-膜相互作用的研究<sup>[12]</sup>, 但它们无法再现 BBB 功能中主动外排、代谢转化等特性<sup>[13]</sup>。现在, 主流研究多从组织和细胞层面上, 寻求有效的材料用于制备 BBB 体外模型。

### 3.1 组织层面

组织层面上, 通过成熟的实验方法, 可以从动物或患者手术切除的脑组织中分离得到具有功能且结构相对完整的脑微管, 其包含脑管内皮细胞、周细胞、基膜及星形胶质细胞等部分<sup>[1]</sup>。基于微管制备 BBB 体外模型, 能维持 BBB 的结构和功能, 而且源于患者的微管能为研究 BBB 的病理改变及药物药效评判提供独特的样本, 拥有巨大的优势<sup>[1]</sup>; 但微管分离纯化涉及机械搅动、酶解、过滤和密度梯度离心等过程, 样品容易污染, BBB 的活性和完整性得不到保障。在样品制备的过程中, 新分离的脑微管代谢活性会逐步消减, 严重影响脑管内皮细胞的可用性。同时, 在后续药物实验中, 分离纯化后的脑微管的变化情况较难表征<sup>[14]</sup>。加上人类脑组织样品较难获取, 这些问题限制了基于脑微管的组织模型的应用。软脑膜微动脉也可用于体外模型的制备, 但其与 BBB 在转运蛋白极性分布、物质的选择通透性、药物代谢等方面有很大差异, 并不实用<sup>[1,15]</sup>。

### 3.2 细胞层面

基于细胞的 BBB 体外模型最早出现在 20 世纪 90 年代初, 随着 BBB 体外模型研发技术的进步, 现在科研人员已经可以利用不同种属来源的原代细胞、细胞系或干细胞, 进行细胞单独培养或不同类型细胞的共培养, 以制备各种功能的 BBB 体外模型<sup>[16]</sup>。结合电子显微镜和酶标记法的研究结果显示, BMECs 是 BBB 发挥屏障作用的关键组分<sup>[16]</sup>。因为 TJs 的存在, 一方面, 能让脑毛细血管形成一层紧密的扩散阻挡层, 导致 BBB 出现高跨内皮电阻 (transendothelial electrical resistance, TEER), 严格限制水溶性物质向脑组织的渗透 (低渗透率)<sup>[16]</sup>; 另一方面, 能保障 BMECs 功能的高度极性, 使细胞血管腔侧和基底外侧的膜上非对称分布转运蛋白等物质<sup>[4,7]</sup>。所以, 现在对于 BMECs 的使用和研究较多, 其来源主要是原代分离培养、成熟的细胞系和干细胞诱导分化, 不同来源细胞的优缺点比较详见表 1。

#### 3.2.1 原代细胞

原代培养的 BMECs 主要来源于新鲜的脑组织, 对于人而言, 主要是患者外科手术切除的脑组织。从患者脑组织中分离的 BMECs 带有疾病特异性, 这为研究 BBB 的发病机制提供了便利<sup>[17]</sup>; 但如果进行大规模的药物递送及通透性研究, 健康的人类原代 BMECs 必不可少, 但其来源受到很大的限制<sup>[16]</sup>。同时, 源自大脑皮层和小脑皮层的 BMECs 特性截然不同, 提示原代培养 BMECs 时应注意细胞来源的均一性<sup>[18]</sup>。作为替代, 牛、猪、大鼠及小鼠可作为 BMECs 原代培养的主要来源<sup>[1,17]</sup>。从形成密闭性屏障的特性上看, 猪的原代 BMECs 较有优势, 对其进行单层细胞单一培养, TEER 能达到 700~800  $\Omega\cdot\text{cm}^2$ <sup>[19]</sup>。牛源和鼠源的原代 BMECs, 与星形胶质细胞或周细胞共培养后, TEER 也能达到 200~400 (甚至 600~700)  $\Omega\cdot\text{cm}^2$ <sup>[20-21]</sup>; 但原代 BMECs 的分离纯化过程复杂且费用昂贵, 加上不同种属和批次

细胞间的差异, 在很大程度上限制了其在实际中的应用。

#### 3.2.2 细胞系

近 20 年间, 人们一直试图从动物和人身上分离得到能用于 BBB 体外模型构建的细胞系, 但很多因形成的屏障特性差 (低 TEER 和高渗透率) 而被淘汰。现在使用比较广泛的是人 CMEC/D3 (hCMEC/D3) 细胞、大鼠 RBE4 细胞和小鼠 bEnd.3 细胞, 尤其是基于 hCMEC/D3 细胞的生物学与药理学研究报道超过 100 篇<sup>[22]</sup>。hCMEC/D3 与人源星形胶质细胞共培养, 静态时 TEER 值可以达到 140  $\Omega\cdot\text{cm}^2$ <sup>[23]</sup>, 在剪切应力存在的情况下可以达到 1 000  $\Omega\cdot\text{cm}^2$  以上<sup>[16]</sup>。hCMEC/D3 细胞传到 35 代依然能够保持 TJs 蛋白、BBB 内皮转运蛋白及受体 (GLUT-1、转铁蛋白受体等) 的表达和极性分布<sup>[22]</sup>。细胞系在培养的过程中依然存在会逐步失去许多 BBB 特有的表型和病理学特征的问题, 但从实用和低成本的角度上讲, 脑血管内皮细胞系, 尤其是 hCMEC/D3 细胞是 BBB 体外模型研发的优先选择。

#### 3.2.3 干细胞

干细胞研究的巨大进步为 BBB 模型的发展注入了新的活力, 尤其是诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPS 细胞)、胚胎干细胞及神经祖细胞已经被用于制备人类 BBB 体外模型<sup>[7]</sup>。研究表明, 利用人 iPS 细胞能分化得到 BMECs, 若将其与周细胞共培养 24 h, TEER 值可以达到 3 500  $\Omega\cdot\text{cm}^2$ <sup>[24]</sup>。诱导分化而来的 BMECs 与星形胶质细胞共培养, 能显著性增强屏障的完整性, TEER 值可达 1 450  $\Omega\cdot\text{cm}^2$ <sup>[25]</sup>。若将人 iPS 来源的 BMECs 与星形胶质细胞共培养在微流控装置上, TEER 值可以达到 4 000  $\Omega\cdot\text{cm}^2$ , 并持续维持在 2 000  $\Omega\cdot\text{cm}^2$  左右<sup>[10]</sup>。从理论上讲, 分离健康个体或患者的干细胞, 诱导分化后可以得到神经血管单元组件, 这就为解决 BBB 体外模型人源细胞来源少、BBB 屏障

表1 不同来源的BMECs优缺点比较

来源	优点	缺点
原代细胞	细胞具有良好的BBB特性, 易于进行病理研究, 实验准确性相对较高 <sup>[17]</sup>	分离纯化过程复杂, 费用昂贵, 分离得到的细胞数量少、来源不均一、易掺杂其他类型细胞, 细胞存在种属和批次间差异 <sup>[1,17]</sup>
细胞系	细胞来源广泛, 易于培养, 实验结果再现性强, 实验成本低 <sup>[22]</sup>	细胞培养过程中会逐步丧失BBB屏障特性, 较难实现脑疾病病理学研究 <sup>[22]</sup>
干细胞	具有诱导分化的优势, 可源源不断提供人源细胞并维持BBB屏障相关特性 <sup>[7]</sup>	实验成本高, 诱导分化过程复杂, 分化细胞纯度受限, 诱导分化技术有待成熟 <sup>[7]</sup>

相关特性差等问题, 以及后续的 CNS 药物筛选、高通量研究提供了现实的解决方案。

### 3.2.4 其他

BBB 体外模型中使用的星形胶质细胞, 可以是原代培养的细胞, 也可以是细胞系, 但培养相对简单的细胞系使用更广泛。研究表明, 猪脑 BMECs 分别与大鼠原代星形胶质细胞、C6 胶质瘤细胞共培养, 两种组合间形成屏障的效果无显著性差异<sup>[21]</sup>。而牛脑 BMECs 与 C6 胶质瘤细胞共培养后能提高 TEER 值, 但其增强效果弱于牛脑 BMECs 与大鼠原代星形胶质细胞共培养的结果<sup>[26]</sup>。

## 4 BBB体外模型装置

当前, 主流的 BBB 体外模型主要是基于细胞层面进行装置研发, 利用不同种属、来源的细胞单独或共培养, 在不同的培养条件下, 尝试再现 BBB 的结构、功能和特性, 代表性的 BBB 体外模型装置特征及其应用详见表 2。

### 4.1 静态培养装置

Transwell 静态培养装置可用于构造简单的 BBB 体外模型, 在细胞迁移、药物渗透性、肿瘤药物毒性等实验中具有高通量的优点<sup>[27]</sup>。Transwell 装置被微孔膜隔成上下两个平行的腔室, 分别代表着 BMECs 的腔面和基底面, 因腔室容积固定, 可利用米氏动力学方程对物质转运进行简化研究<sup>[27]</sup>。微孔膜的孔径为 0.4~8  $\mu\text{m}$ , 允许物质交换, 但孔径越小对细胞迁移的限制越大。实验表明, 利用 Transwell 接种单层猪脑 BMECs 时, 细胞间可以形成 TJs 且 TEER 值可以达到 800~1300  $\Omega\cdot\text{cm}^2$ <sup>[19]</sup>。但是, 仅在微孔膜上接种单层 BMECs, 会出现细胞加速去分化、细胞黏着不规则、细胞间形成 TJs 不完整、边缘效应诱发的细胞旁扩散等问题<sup>[28]</sup>。现有研究证实, 星形胶质细胞对 BMECs 极性分布、TJs 表达等有积极的影响, 而且 BMECs 与星形胶质细胞共培养的 TEER 值远高于仅单层 BMECs 存在的情况<sup>[29]</sup>。因此, 利用 Transwell 实验时, 建议不同种属和来源的脑血管内皮细胞与胶质细胞等共培养, 以维持 BBB 特性<sup>[30]</sup>。BMECs、胶质细胞与周细胞也可共培养于 Transwell 装置中, 更好地实现 BBB 的特性<sup>[31]</sup>。但对于 Transwell 装置而言, 三种细胞共培养增加了装置的复杂性, 降低了实用性, 这对于相对简单的药物渗透实验和机制研究是否必要, 仍有争论。

### 4.2 动态(微环境调控)培养装置

现已证明, 微环境对细胞功能的发挥极其重要,

除了与星形胶质细胞、周细胞的细胞间相互作用, BMECs 细胞分化及 BBB 特性维持还需要剪切应力等微环境因素<sup>[28]</sup>。Transwell 等静态培养装置无法提供调控 BMECs 所需的剪切应力, 因此, 平行板流室 (parallel-plate flow chambers)、微流控系统 (microfluidic systems) 等可调控微环境的 BBB 体外模型应运而生。

#### 4.2.1 单培养装置

典型的平行板流室装置由上层 (聚碳酸酯材质)、下层 (玻璃盖玻片) 以及硅垫 (填充于上下层之间) 组成。聚碳酸酯材质的上层分布有进样口、出样口和真空槽。玻璃盖玻片可用胶原蛋白、纤连蛋白等包被, 是单层细胞培养的场所。而硅垫的厚度决定了装置上下层之间形成的真空流道的高度。平行板流室可用于转移性肿瘤细胞与脑血管内皮的黏附作用、肿瘤细胞跨内皮迁移、白细胞与 BMECs 相互作用、细胞趋药性、微环境调控细胞形态以及药物对脑血管内皮细胞功能影响方面的研究<sup>[32]</sup>。平行板流室装置的优点包括: (1) 能再现机体生理状态下的剪切应力, 范围从 0.01~30  $\text{dyn}/\text{cm}^2$ ; (2) 装置设计简单, 方便使用; (3) 细胞用量少; (4) 装置透明, 便于实时长期显微观察; (5) 可扩展成类似 Transwell 的装置<sup>[33]</sup>。但平行板流室装置无法实现 BMECs 与胶质细胞、周细胞的共培养, 无法再现 BBB 真实的功能特性。

#### 4.2.2 微流控培养装置

过去几年中, 为克服单培养动态模型的缺陷, 更好地模拟 BBB 结构和特性, 微流控 BBB 体外模型 (微流控系统) 走上舞台, 且种类层出不穷。微流控系统在高通量药物筛选、实时动态监测 TEER 等方面进行了积极的尝试。

热塑性聚合物 (如聚丙烯) 可制备形成中空纤维结构, 动态 BBB 体外模型 (dynamic *in vitro* BBB model, DIV-BBB) 就是利用这种中空纤维结构模拟脑微脉管<sup>[34]</sup>。在 DIV-BBB 中, BMECs 接种培养在人造微脉管的内表面 (腔面) 上并暴露于近生理脉动流中, 星形胶质细胞并行培养于中空纤维的外表面 (基底面), 两种细胞的空间分布及培养环境类似于在体微脉管的状态。DIV-BBB 装置连接有变速泵, 能产生脉冲式流动, 基于人造微脉管内径大小、腔内液体的黏度及流量等参数, 可调控所产生的剪切应力的大小, 并将其控制在 5~23  $\text{dyn}/\text{cm}^2$  的范围内, 与在体 CNS 的数据一致<sup>[35]</sup>。此外, DIV-BBB 装置允许共培养胶质细胞, 使 BMECs 表现出更加

表2 代表性BBB体外模型装置特征及其应用

名称	装置结构 (自下而上)	结构尺寸 (宽×高)	膜的材质 及厚度	细胞类型	剪切应力	优缺点	应用
Transwell 装置 <sup>[27]</sup>	塑料-聚合物 膜-塑料	—	PTFE、 PC等 聚合物	各种类型 的脑内 皮细胞	—	结构简单、易操作、兼容性 好、可进行高通量药物筛 选；但需要细胞共培养来 维持BBB特性，无法模拟 BBB所处微环境的变化	用于药物渗透性、肿瘤药 物毒性、细胞迁移实验等 <sup>[27]</sup>
平行板流室 装置 <sup>[32]</sup>	PC-硅垫- 玻璃	—	—	内皮细胞、 肿瘤细胞 等	0.01~30 dyn/cm <sup>2</sup>	装置设计简单、便于实时 长期显微观察、可提供 机体生理状态下的剪切 应力；但仅能进行单层 细胞培养，无法实现细 胞共培养	用于细胞趋药性、药物对 脑血管内皮细胞功能调 控、肿瘤细胞跨内皮迁 移方面的研究 <sup>[1,32]</sup>
3D NVU 装置 <sup>[43]</sup>	PDMS-PTFE -PDMS	1mm × 150 μm	PTFE, 40 μm	bEnd.3、 C8D1A	5 dyn/cm <sup>2</sup>	3D细胞培养、细胞共培 养提供剪切应力、细胞 实时显微观察；但无法 实时监测TEER值	用于进行药代动力学实 验及CNS药物筛选等 <sup>[43]</sup>
μBBB 装置 <sup>[38]</sup>	PDMS-PC- PDMS	2 mm × 3 mm	PC, 10 μm	bEnd.3、 C8D1A	0.023 dyn/cm <sup>2[39]</sup>	低成本，可实现腔面和基 底面液体流动、显微成 像清晰、TEER实时监 测、细胞共培养；但调 控微环境变化的能力弱	用于药物筛选、药物转 运研究，监控BBB对外 界刺激物的反应 <sup>[38,40]</sup>
NVU芯片 <sup>[41]</sup>	玻璃-PDMS- PC-PDMS	10 mm × 100 μm	PC, 7 μm	RBE4、鼠 源E18神 经细胞	—	构建神经与血管信息通 讯，再现完整的BBB结 构，药物筛选准确性高 ；但装置较复杂，细胞 无法进行长期培养	用于药物功效和毒性预 测、神经元与脑脊液相 互作用、脑组织中化学 通讯、分子示踪、炎症 发生等研究 <sup>[41-42]</sup>
SyM-BBB 装置 <sup>[37]</sup>	玻璃-PDMS	200 μm × 100 μm	PDMS, —	RBE4、 ACM	3 mPa <sup>[46]</sup>	低成本、简单易用、显 微观察方便，能实现液 体的连续灌注；但无法 进行共培养、高通量药 物筛选及TEER实时检 测	用于神经药物筛选、生 理状态下BBB信号通路 以神经疾病中BBB功能 紊乱机制研究 <sup>[37]</sup>
NV生物反 应器 <sup>[44]</sup>	PDMS-PC- PDMS- PDMS	6.2 mm × 100 μm	PC, —	hBMVEC、 周细胞、 hiPS来源 的神经元	2 mPa <sup>[46]</sup>	全部采用人源细胞构建 模型、神经元3D培养、 对腔面和基底面物质运 输分别控制；但装置制 备相对复杂，TEER无法 实时监控	用于药物渗透性及毒性 、药物对神经元的作用 、神经元对BBB功能的 影响等研究 <sup>[44]</sup>
3D BBB 装置 <sup>[45]</sup>	PDMS-PDMS	—	—	hCMEC/D3、 人星形胶 质细胞	0.7 dyn/cm <sup>2</sup>	能实现3D细胞培养、细 胞共培养，提供剪切应 力和周期性收缩等力学 变化；但其在TEER值 实时监测、药物高通量 筛选方面存在缺陷	用于药物筛选，研究剪 切应力、血管周期性收 缩对BBB物质运输、内 皮细胞功能的影响 <sup>[45]</sup>

注：PDMS (polydimethylsiloxane)，聚二甲硅氧烷；PTFE (polytetrafluoroethylene)，聚四氟乙烯；PC (polycarbonate)，聚碳酸酯；bEnd.3，小鼠脑内皮细胞；C8D1A，鼠源星形胶质细胞；hCMEC/D3，人源脑微血管内皮细胞；RBE4，大鼠脑内皮细胞；ACM (astrocyte conditioned media)，星形胶质细胞条件培养基；hBMVEC，人源脑微血管内皮细胞。

优异的 BBB 特性, 如低细胞旁通透性、高 TEER、特异性转运蛋白极性分布等, 这对于提高 CNS 药物筛选的准确性和有效性非常重要; DIV-BBB 装置能长时间维持细胞活性和 BBB 的特性, 并模拟中风等疾病中流变环境的改变, 使其具有扩展制备神经疾病模型的能力<sup>[36]</sup>。DIV-BBB 装置同样存在缺陷, 如破坏 BBB 模型才能表征中空管内表面培养细胞的状况, 聚丙烯等亲脂材料的使用会影响亲脂性药物运输结果的真实性, 无法实现药物高通量筛选等<sup>[1]</sup>。

合成微脉管 BBB (synthetic microvasculature BBB, SyM-BBB) 装置是一种由玻璃和聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 构成的低成本、简易微流控芯片, 由分布于同一水平面上的腔面和基底面通道组成, 通道孔径为  $3\ \mu\text{m}\times 3\ \mu\text{m}$ , 彼此间可以进行液体交换<sup>[37]</sup>。BMECs 培养于腔面通道, 与星形胶质细胞条件培养基等相互作用后, 可形成 TJs 并高表达紧密连接蛋白 -1 和 P-gp 蛋白<sup>[37]</sup>。该装置便于光学观察并能实现液体的连续灌注, 在神经系统疾病药物药效评价、正常生理状态下 BBB 信号传导机制和 BBB 功能紊乱致病机理研究中有潜在的应用, 但也存在无法检测 TEER 值、无法与星形胶质细胞等共培养、无法进行高通量筛选等缺陷<sup>[1]</sup>。

微流体 BBB (microfluidic BBB,  $\mu\text{BBB}$ ) 装置由 4 层 PDMS 和 2 个嵌入式电极构成, 腔面和基底面通道均可实现液体流动, 能清晰成像 (PDMS 材质透明), 并可轻松地实时监测 TEER<sup>[38]</sup>。流体灌注状态下, 利用  $\mu\text{BBB}$  装置共培养鼠源 BMECs 和星形胶质细胞, TEER 值超过  $250\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ , 是该装置静态培养下 TEER 值的 10 倍。 $\mu\text{BBB}$  装置是一种低成本、可再生的微流控平台, 但其产生的剪切应力 ( $2.3\times 10^{-2}\ \text{dyn}/\text{cm}^2$ ) 远低于正常机体的数值<sup>[39]</sup>。作为发展, BBB 芯片 (BBB-on-a-chip) 仅由两层 PDMS 及中间  $10\ \mu\text{m}$  厚的聚碳酸酯膜构成, 每一层均分布有细槽 (宽  $500\ \mu\text{m}$ , 高  $100\ \mu\text{m}$ ) 和铂电极。BBB 芯片虽然设计极简单, 但实验过程中可提供正常生理范围内的剪切应力, 具有扩展构建人类脑相关疾病模型的能力; 易于显微观察和 TEER 检测的特点, 使此类装置便于监控 BBB 对外界刺激物 (如各种药物) 的反应, 在药物转运、药物筛选等方面有广泛的应用前景<sup>[38-40]</sup>。

NVU 芯片 (neurovascular unit-on-a-chip) 由神经模块 (神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞) 和血管模块 (BMECs) 组成, 两个模块分别培养细胞后再组装在一起, 用于研究神经血管间的相互作用<sup>[41]</sup>。

相关研究表明, 加入肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 可使葡萄聚糖的通透性增加 2 倍, 表明 NVU 芯片形成的 BBB 模型具备正常的功能<sup>[42]</sup>。在血管模块中添加 TNF- $\alpha$ , 可促进神经模块中小胶质细胞形态的变化并显著增强胶质纤维酸性蛋白的表达<sup>[42]</sup>。NVU 芯片在神经元与脑脊液相互作用、脑组织中化学信号传递、神经系统疾病发生中炎症的作用机制、药物功效和毒性预测等方面广泛应用, 表明了该装置的应用优势, 但该装置并未考虑神经模块长期培养等问题, 仍有改进的空间<sup>[42]</sup>。

3D NVU 装置 (three-dimensional neurovascular unit model) 是在 PDMS 中间嵌合纳米多孔膜制备成的一种微流控 NVU 装置, 该装置可进行 3D 细胞培养并提供  $5\ \text{dyn}/\text{cm}^2$  左右的剪切应力<sup>[43]</sup>。在 3D NVU 装置中, 脑内皮细胞生长在透明的聚四氟乙烯纳米多孔膜上, 脑内皮细胞的形态、蛋白表达情况可通过染色 (在不破坏装置的前提下) 直接用显微镜观察; 与脑内皮细胞共培养的星形胶质细胞生长在 3D 鼠尾胶原水凝胶中, 3D 培养的星形胶质细胞在第 4 天时活性仍高于 90%; 脑内皮细胞和星形胶质细胞能形成良好的屏障并可共培养至少 14 d<sup>[43]</sup>。3D 基质和聚四氟乙烯纳米膜的使用, 使该装置在构建细胞 3D 培养环境和实时显微观察方面显现出了优势, 为 CNS 药物代谢动力学实验、药效分析、脑内皮细胞功能研究等提供了便利, 但其依然存在无法实时监测 TEER 值等问题<sup>[43]</sup>。

NV 生物反应器 (neurovascular bioreactor) 是通过 3 层 PDMS 和 1 层聚碳酸酯膜构建形成的 BBB 体外模型, 该生物反应器有 2 条灌注通道, 1 条用于流通原代脑内皮细胞所需的培养基, 另外 1 条用于流通原代星形胶质细胞、原代周细胞和神经元 (hiPS 细胞诱导分化而来) 所需的培养基, 实现了对 BBB 腔面和基底面的物质 (如药物、营养) 运输的分别控制<sup>[44]</sup>。基于 I 型胶原的神经元 3D 培养、全部 4 种人源细胞及 2 条微流控通道的应用, 使 NV 生物反应器成功再现了 BBB 的结构和功能。全人源细胞的使用, 使得该装置能更真实地反映药物对神经元的效用, 更准确地得到药物渗透性及毒性数据, 更有效地揭示神经元对 BBB 功能正常发挥的作用机制, 但 TEER 实时监控方面的缺陷以及相对复杂的装置制备过程限制了其应用空间<sup>[44]</sup>。

类机体 BBB 芯片 (*in vivo-like* BBB chip) 由 3D 打印的盖板、腔室层、灌注层以及 1 个细胞培养区构成, 通过多孔膜两侧共培养 BMECs (人源 iPS

细胞诱导而来)及大鼠原代星形胶质细胞,能长时间模拟并维持在体 BBB 的特性<sup>[10]</sup>。该微流控装置的最大特点是基于人脑中血液的滞留时间进行设计,可以在无泵驱动的前提下,利用管壁剪切应力调控细胞间 TJs 的形成,同时实现细胞的长时间共培养(10 d 以上)<sup>[10]</sup>。咖啡因、西咪替丁和阿霉素等药物实验表明,类机体 BBB 芯片可利用循环灌注对药物渗透性进行研究,且获得的渗透系数等结果与体内数据有可比性<sup>[10]</sup>。

基于以上微流控 BBB 体外模型,血液流动产生的剪切应力对 BBB 功能的影响被深入研究,但血液流动还伴有其他力学性质的改变,如血管的周期性收缩。微流控 BBB 体外模型中,聚合物膜的使用在为脑内皮细胞提供支持的同时,也限制了其周期性收缩发生的可能<sup>[45]</sup>。因此,Partyka 等<sup>[45]</sup>制备了一种基于 PDMS 的新型 3D BBB (3D blood-brain barrier model) 装置,其首先将含有基质胶、I 型胶原、人源星形胶质细胞等组分的混合液加入 PDMS 装置中的人源星形胶质细胞培养区,并插入直径 180 mm 的针灸针,待水凝胶形成后拔掉针灸针,形成带有通道的星形胶质细胞 3D 培养的结构;然后,将 hCMEC/D3 种植到通道中,旋转装置使细胞覆盖通道内壁。该装置在灌流的过程中,不仅能产生剪切应力,还能使通道搏动,这使得体外研究血管周期性收缩调控 BBB 基膜中废物转运、脑内皮细胞药物渗透等问题成为可能<sup>[45]</sup>。通过在通道两侧外接不同设备,可实现对液体流速和脑内皮细胞周期性收缩的控制,以及 TEER 值的检测,这对于研究剪切应力、血管周期性收缩对 BBB 物质运输及内皮细胞功能的影响非常重要,也有利于提高药效研究的真实性和准确性。该装置在 TEER 值实时监测、药物高通量筛选等方面还需进一步改进。

## 5 展望

从低成本、易操作的单层 BMECs 培养模型,到共培养、三培养的静态模型,再到细胞微环境可控的微流控系统, BBB 体外模型一直在向离体再现 BBB 在体功能的方向发展。随着生物技术、材料工程等学科的发展,现有 BBB 体外模型在简单细胞微环境再现、血液动力学调控、对刺激物进行病理/生理反应等方面实现了突破,但“类生理”状态再现不是对 BBB 在体生理功能的完全再现。相对于结构复杂,多种细胞和组分相互紧密协作且多样微环境并存的在体 BBB 而言, BBB 体外模型更多

地是在离体且严格受控的环境下,评估特定刺激物的生理或病理反应,而这些反应往往很难直接利用人体进行重现、修改或描述。例如,将基于干细胞的 BBB 体外模型作为 CNS 药物筛选的平台,可以更准确地评估药物的治疗效果和副作用,在加速药物研发进程的同时,避免盲目临床试验的高昂费用。

BBB 体外模型虽然越来越接近于人类机体,但现在依然缺乏非常可靠的在体实验和 BBB 体外模型的关联数据,基于 BBB 体外模型的药物渗透性实验结果还无法直接用于体内实验。虽然 BBB 体外模型与在体 BBB 仍存在较大差异,但现阶段 CNS 相关疾病的研究和 CNS 疾病治疗药物的研发,需要低成本、高通量筛选、高仿真、高重现率的 BBB 体外模型,而且微流控装置的发展为仿真 BBB 模型的制备指明了方向。利用新技术、新工艺、新方法和新材料,制备具有 3D 组织构造、多种细胞相互作用、细胞微环境可准确调控以及高通量药物筛选的 BBB 体外模型,最终会加速 CNS 相关疾病研究、治疗药物研发等诸多变革。

## [参 考 文 献]

- [1] Palmiotti CA, Prasad S, Naik P, et al. *In vitro* cerebrovascular modeling in the 21st century: current and prospective technologies. *Pharm Res*, 2014, 31: 3229-50
- [2] Ingber DE. Reverse engineering human pathophysiology with organs-on-chips. *Cell*, 2016, 164: 1105-9
- [3] Yao Y, Chen ZL, Norris EH, et al. Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood brain barrier integrity. *Nat Commun*, 2014, 5: 3413
- [4] Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7: 41-53
- [5] Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, et al. Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier. *Cell*, 2015, 163: 1064-78
- [6] Hall CN, Reynell C, Gesslein B, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, 2014, 508: 55-60
- [7] Kaiser MA, Sajja RK, Prasad S, et al. New experimental models of the blood-brain barrier for CNS drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 2017, 12: 89-103
- [8] Sweeney MD, Ayyadurai S, Zlokovic BV. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci*, 2016, 19: 771-83
- [9] Leist M, Hartung T. Inflammatory findings on species extrapolations: humans are definitely no 70-kg mice. *Arch Toxicol*, 2013, 87: 563-7
- [10] Wang YI, Abaci HE, Shuler ML. Microfluidic blood-brain barrier model provides *in vivo*-like barrier properties for drug permeability screening. *Biotechnol Bioeng*, 2017,

- 114: 184-94
- [11] Adriani G, Ma D, Pavesi A, et al. A 3D neurovascular microfluidic model consisting of neurons, astrocytes and cerebral endothelial cells as a blood-brain barrier. *Lab Chip*, 2017, 17: 448-59
- [12] Grumetto L, Russo G, Barbato F. Immobilized artificial membrane HPLC derived parameters vs PAMPA-BBB data in estimating *in situ* measured blood-brain barrier permeation of drugs. *Mol Pharm*, 2016, 13: 2808-16
- [13] Chaves C, Shawahna R, Jacob A, et al. Human ABC transporters at blood-CNS interfaces as determinants of CNS drug penetration. *Curr Pharm Des*, 2014, 20: 1450-62
- [14] Cannon RE, Peart JC, Hawkins BT, et al. Targeting blood-brain barrier sphingolipid signaling reduces basal P-glycoprotein activity and improves drug delivery to the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 15930-5
- [15] Ghosh C, Marchi N, Desai NK, et al. Cellular localization and functional significance of CYP3A4 in the human epileptic brain. *Epilepsia*, 2011, 52: 562-71
- [16] Wilhelm I, Krizbai IA. *In vitro* models of the blood-brain barrier for the study of drug delivery to the brain. *Mol Pharm*, 2014, 11: 1949-63
- [17] Gupta P, Kumar M, Bhardwaj N, et al. Mimicking form and function of native small diameter vascular conduits using mulberry and non-mulberry patterned silk films. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 15874-88
- [18] Burek M, Salvador E, Forster CY. Generation of an immortalized murine brain microvascular endothelial cell line as an *in vitro* blood brain barrier model. *J Vis Exp*, 2012, e4022
- [19] Patabendige A, Skinner RA, Abbott NJ. Establishment of a simplified *in vitro* porcine blood-brain barrier model with high transendothelial electrical resistance. *Brain Res*, 2013, 1521: 1-15
- [20] Wilhelm I, Fazakas C, Krizbai IA. *In vitro* models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol Exp: Wars*, 2011, 71: 113-28
- [21] Abbott NJ, Dolman DE, Drndarski S, et al. An improved *in vitro* blood-brain barrier model: rat brain endothelial cells co-cultured with astrocytes. *Methods Mol Biol*, 2012, 814: 415-30
- [22] Weksler B, Romero IA, Couraud PO. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS*, 2013, 10: 16
- [23] Daniels BP, Cruz-Orengo L, Pasieka TJ, et al. Immortalized human cerebral microvascular endothelial cells maintain the properties of primary cells in an *in vitro* model of immune migration across the blood brain barrier. *J Neurosci Methods*, 2013, 212: 173-9
- [24] Lippmann ES, Al-Ahmad A, Azarin SM, et al. A retinoic acid-enhanced, multicellular human blood-brain barrier model derived from stem cell sources. *Sci Rep*, 2014, 4: 4160
- [25] Lippmann ES, Azarin SM, Kay JE, et al. Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 783-91
- [26] Silbergeld DL, Ali-Osman F. Isolation and characterization of microvessels from normal brain and brain tumors. *J Neurooncol*, 1991, 11: 49-55
- [27] Berezowski V, Landry C, Lundquist S, et al. Transport screening of drug cocktails through an *in vitro* blood-brain barrier: is it a good strategy for increasing the throughput of the discovery pipeline? *Pharm Res*, 2004, 21: 756-60
- [28] Cucullo L, Hossain M, Puvenna V, et al. The role of shear stress in blood-brain barrier endothelial physiology. *BMC Neurosci*, 2011, 12: 40
- [29] Hori S, Ohtsuki S, Tachikawa M, et al. Functional expression of rat ABCG2 on the luminal side of brain capillaries and its enhancement by astrocyte-derived soluble factor(s). *J Neurochem*, 2004, 90: 526-36
- [30] Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, et al. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6: 650-61
- [31] Hatherell K, Couraud PO, Romero IA, et al. Development of a three-dimensional, all-human *in vitro* model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *J Neurosci Methods*, 2011, 199: 223-9
- [32] Zhao F, Li L, Guan L, et al. Roles for GP IIb/IIIa and  $\alpha\beta 3$  integrins in MDA-MB-231 cell invasion and shear flow-induced cancer cell mechanotransduction. *Cancer Lett*, 2014, 344: 62-73
- [33] Man S, Tucky B, Cotleur A, et al. CXCL12-induced monocyte-endothelial interactions promote lymphocyte transmigration across an *in vitro* blood-brain barrier. *Sci Transl Med*, 2012, 4: 119ra14
- [34] Cucullo L, Hossain M, Tierney W, et al. A new dynamic *in vitro* modular capillaries-venules modular system: cerebrovascular physiology in a box. *BMC Neurosci*, 2013, 14: 18
- [35] Koutsiaris AG, Tachmitzi SV, Batis N, et al. Volume flow and wall shear stress quantification in the human conjunctival capillaries and post-capillary venules *in vivo*. *Biorheology*, 2007, 44: 375-86
- [36] Cucullo L, Couraud PO, Weksler B, et al. Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28: 312-28
- [37] Prabhakarandian B, Shen MC, Nichols JB, et al. SyM-BBB: a microfluidic blood brain barrier model. *Lab Chip*, 2013, 13: 1093-101
- [38] Booth R, Kim H. Characterization of a microfluidic *in vitro* model of the blood-brain barrier (muBBB). *Lab Chip*, 2012, 12: 1784-92
- [39] Griep LM, Wolbers F, de Wagenaar B, et al. BBB on chip: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function. *Biomed Microdevices*, 2013, 15: 145-50
- [40] Booth R, Kim H. Permeability analysis of neuroactive drugs through a dynamic microfluidic *in vitro* blood-brain barrier model. *Ann Biomed Eng*, 2014, 42: 2379-91
- [41] Achyuta AK, Conway AJ, Crouse RB, et al. A modular approach to create a neurovascular unit-on-a-chip. *Lab*



- Chip, 2013, 13: 542-53
- [42] Alcendor DJ, Block FE 3rd, Cliffl DE, et al. Neurovascular unit on a chip: implications for translational applications. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4 Suppl 1: S18
- [43] Sellgren KL, Hawkins BT, Grego S. An optically transparent membrane supports shear stress studies in a three-dimensional microfluidic neurovascular unit model. *Biomicrofluidics*, 2015, 9: 061102
- [44] Brown JA, Pensabene V, Markov DA, et al. Recreating blood-brain barrier physiology and structure on chip: a novel neurovascular microfluidic bioreactor. *Biomicrofluidics*, 2015, 9: 054124
- [45] Partyka PP, Godsey GA, Galie JR, et al. Mechanical stress regulates transport in a compliant 3D model of the blood-brain barrier. *Biomaterials*, 2017, 115: 30-9
- [46] Helm MVD, Meer AVD, Eijkel J, et al. Microfluidic organ-on-chip technology for blood-brain barrier research. *Tissue Barriers*, 2016, 4: e1142493