

文章编号: 1001-6325(2022)05-0714-07

研究论文

血脑屏障体外细胞模型的建立与比较

苏钰雯, 修建波, 许琪*

(中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 生物化学与分子生物学系
医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)

摘要:目的 构建不同培养模式的血脑屏障(BBB)体外细胞模型并进行结构和功能的比较和分析。方法 用人脑微血管内皮细胞系(hCMEC/D3)、人脑星形胶质母细胞瘤细胞系(U87MG)和人脑血管周细胞系(HBVP)3种细胞在Transwell装置中构建细胞模型。根据细胞种类和细胞位置的不同,将模型分为单培养、双培养(hCMEC/D3+U87MG或HBVP)、不接触共培养、半接触共培养和全接触共培养5种血脑屏障体外细胞模型。检测模型的通透性和渗透性以及相关蛋白和基因的表达,比较不同模型的结构和功能特点并分析。结果 与单培养和双培养模型相比,共培养模型的渗透性降低,紧密性升高,血脑屏障相关的基因和蛋白的表达也升高($P<0.05$)。在共培养模型中,半接触和全接触培养模型具有更低的渗透性($P<0.001$),全接触细胞培养模型的紧密性更高($P<0.01$),部分血脑屏障相关蛋白和基因的表达也更高($P<0.05$)。结论 全接触共培养细胞模型具有更优的血脑屏障相关性质,更适用于血脑屏障研究。

关键词: 内皮细胞;星形胶质细胞;周细胞;血脑屏障;共培养

中图分类号:R338.2 文献标志码:A

Establishment and comparison of *in vitro* blood-brain barrier cell models

SU Yu-wen, XIU Jian-bo, XU Qi*

(State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Department of Molecular Biology and Biochemistry,
Institute of Basic Medical Sciences CAMS, School of Basic Medicine PUMC, Beijing 100005, China)

Abstract: Objective To construct and evaluate the *in vitro* models of blood-brain barrier (BBB) and to analyze their structural and functional characteristics. **Methods** Human microvascular endothelial cell line (hCMEC/D3), Uppsala 87 malignant glioma cell line (U87MG) and human brain vascular pericyte (HBVP) cell line were used to construct blood-brain barrier cell models. The models were divided into single-culture model, bi-culture (hCMEC/D3+U87MG or HBVP), no-contact co-culture model, semi-contact co-culture and full-contact co-culture model according to different cell types and cell locations. The permeability and tightness of the models as well as the expression of related proteins and genes were detected for comparing and analyzing the structural and functional characteristics of different models. **Results** Compared with the single-culture model and the bi-culture model, the permeability and compactness of the co-culture model decreased and the expression of BBB-related

收稿日期:2022-02-07 修回日期:2022-03-22

基金项目:国家自然科学基金(81930104,31970952);国家重点研发计划(2020YFA0804502);中国医学科学院创新工程项目(2021-1-I2M-020)

*通信作者(corresponding author):xuqi@pumc.edu.cn

genes and proteins also increased ($P < 0.05$). In the co-culture models, full-contact co-culture model showed higher compactness ($P < 0.01$) and higher BBB-related protein and gene expression. Semi-contact and full-contact culture model had lower permeability ($P < 0.05$). **Conclusions** Full-contact co-culture model has better BBB-related properties and is more suitable for BBB research.

Key words: endothelial cell; astrocyte; pericyte; blood-brain barrier; co-culture

作为血液和中枢神经系统之间的动态复杂界面,血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)具有双重功能,即屏障和载体功能^[1],既能输送脑细胞正常代谢所必需的营养物质,又能阻隔许多有毒化合物和病原体,具有保护作用^[2-3]。血脑屏障是一种选择性渗透屏障,大多数中枢神经系统候选药物在血脑屏障中的渗透性差,无法通过。基于细胞培养的体外 BBB 模型应运而生,利用原代细胞、永生化细胞系^[4]或者干细胞^[5]建立可靠的体外血脑屏障模型可以更准确地模拟体内屏障,这样的系统允许探索神经疾病恢复的新可能性。

星形胶质细胞包被中枢神经系统血管并赋予内皮细胞 BBB 特性^[6]。周细胞与神经血管单位的各种成员相互作用,支持内皮细胞的萌发、分化和成熟来促进血脑屏障的发育^[7]。本研究旨在探究星形胶质细胞和周细胞对血脑屏障结构和功能的影响,探究不同培养方式下血脑屏障细胞模型结构和功能的变化。

1 材料与方法

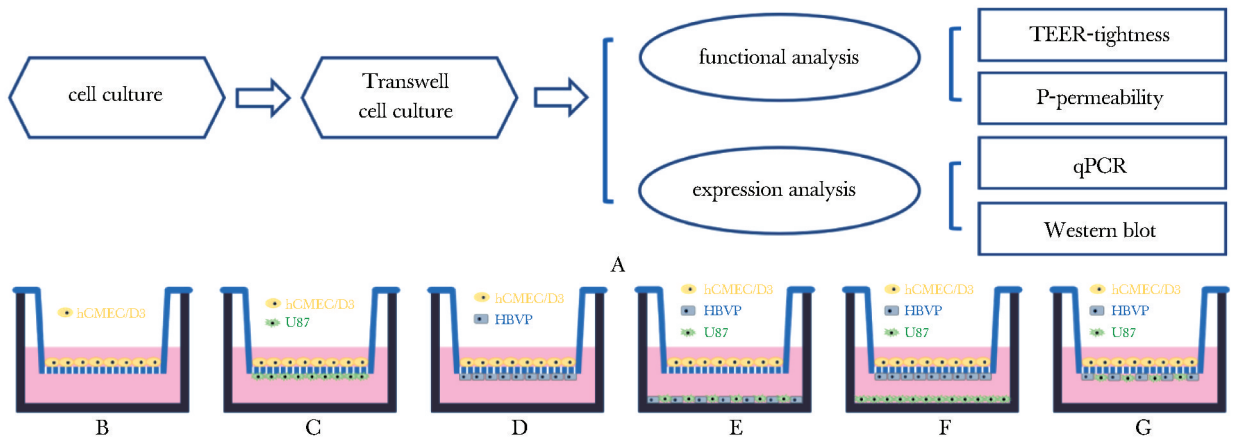
1.1 材料

1.1.1 细胞:人脑微血管内皮细胞系 hCMEC/D3、人脑星形胶质母细胞瘤细胞系 U87MG、人脑血管周细胞系 HBVP(上海信裕公司)。

1.1.2 主要试剂:hCMEC/D3 细胞专用培养基(XY-h070-0016)(上海信裕公司);细胞培养用胎牛血清、DMEM 培养基(16000-044、11995-065)(Gibco 公司);PBS、0.25% 胰蛋白酶、青霉素链霉素(CC008、CC017、CC004)(Macgene 公司);10 kD 异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FD10S)(Sigma-Aldrich 公司);PECAM-1(CD31)抗体、Glut1 抗体、LRP-1 抗体(ab76533、ab115730、ab92544)(Abcam 公司);P Glycoprotein 抗体(ab170904)(Abcam 公司);Trizol(15596018)(Invitrogen 公司);cDNA 合成试剂盒(Roche 公司)。

1.2 方法

1.2.1 血脑屏障体外细胞模型的构建(图 1):对人脑微血管内皮细胞 hCMEC/D3、人脑星形胶质母细胞瘤细胞 U87MG、人周细胞 HBVP 进行常规细胞培养。模型分为 5 组:1)单培养模型(仅培养 hCMEC/D3):在 Transwell 正面铺 hCMEC/D3,在上室加入 100 μL 浓度为 2×10^4 个/mL 的 hCMEC/D3 细胞悬液;2)双培养模型(hCMEC/D3 与 U87MG 或 HBVP 双培养):将 Transwell 装置翻转,铺 HBVP 或 U87MG,用移液枪小心吸取 50 μL 浓度为 5×10^4 个/mL 的 HBVP 细胞悬液或浓度为 4×10^4 个/mL 的 U87MG 细胞悬液,培养 12 h 后正置 Transwell,继续铺 hCMEC/D3,在上室加入 100 μL 浓度为 2×10^4 个/mL 的 hCMEC/D3 细胞悬液,在细胞培养箱中孵育培养;3)不接触共培养模型(hCMEC/D3 与 U87MG 及 HBVP 均不接触):在孔板底面铺 HBVP,加入浓度为 2.8×10^4 个/mL 的 HBVP 细胞悬液 300 μL ,12 h 后继续加入浓度为 2×10^4 个/mL 的 U87MG 细胞悬液 300 μL ,细胞培养箱中继续培养 12 h,在 Transwell 上铺 hCMEC/D3,在上室加入 100 μL 浓度为 2×10^4 个/mL 的 hCMEC/D3 细胞悬液;4)半接触共培养模型(hCMEC/D3 与 HBVP 通过 Transwell 膜接触,不接触 U87MG):Transwell 装置翻转,铺 HBVP,加入浓度为 5×10^4 个/mL 的 HBVP 细胞悬液 50 μL ,12 h 后在孔板底面铺 U87MG,加入浓度为 2×10^4 个/mL 的 U87MG 细胞悬液 300 μL ,培养 12 h 后正置 Transwell,继续铺 hCMEC/D3,在上室加入 100 μL 浓度为 2×10^4 个/mL 的 hCMEC/D3 细胞悬液;5)全接触共培养模型(hCMEC/D3 通过 Transwell 膜接触 HBVP 和 U87MG):Transwell 装置翻转,铺 HBVP,加入浓度为 2.8×10^4 个/mL 的 HBVP 细胞悬液 50 μL ,12 h 后继续铺 U87MG,加入浓度为 2×10^4 个/mL 的 U87MG 细胞悬液 50 μL ,培养 12 h 后正置 Transwell,继续铺 hCMEC/D3 在上室加入 100 μL 浓度为 $2 \times$



Human microvascular endothelial cell (hCMEC/D3), Uppsala 87 malignant glioma (U87MG) cell and human pericyte (HBVP) were used to construct blood-brain barrier cell models; BEC. brain endothelial cell; A. schematic representation of the blood-brain barrier cell models; B-G. different types of models; B. only human microvascular endothelial cells; C. bi-cultures (U87+BEC); D. bi-cultures (HBVP+BEC); E. co-cultures (no-contact); F. co-cultures (semi-contact); G. co-cultures (full-contact)

图1 血脑屏障体外细胞模型的示意图

Fig 1 Schematic representation of *in vitro* blood-brain barrier cell models

10^4 个/mL的hCMEC/D3细胞悬液。恒温细胞培养箱培养(37℃、5%CO₂)。

1.2.2 渗透性检测:待细胞形成致密单层之后,对模型进行通透性检测实验。Transwell上室加入0.5 mg/mL的FITC-葡聚糖溶液(无血清、无酚红DMEM配制)0.1 mL,下室加入0.5 mg/mL的无FITC标记的葡聚糖溶液(无血清、无酚红DMEM配制)0.6 mL。置于细胞培养箱孵育1 h后分别从Transwell装置的上、下室提取样品,进行荧光分光光度计检测。计算细胞层的Pd值。 $Pd (cm/s) = (C/t) / (1/A) \times (V/L)$ (C是下室FITC-葡聚糖浓度, t 是时间间隔, A 是表面积, V 是下室溶液体积, L 是上室FITC-葡聚糖浓度)。因为葡萄糖浓度可用样品荧光强度表示,不同模型的 t 、 A 及 V 均相同,所以利用 $P = F1/F2$ ($F1$ -上室样品荧光强度, $F2$ -下室样品荧光强度)来表示各模型的通透性。检测未培养细胞的空白对照组Transwell的渗透性 P_0 ,以各模型 P 值与 P_0 的比值来进行模型组间渗透性的比较。

1.2.3 紧密性检测:电阻仪EVOM2的STX2电极分别插入Transwell装置的上室和下室管腔侧。测量并记录细胞层的电阻值TEER。检测未培养细胞的空白对照组Transwell的紧密性 T_0 ,以各模型TEER值与 T_0 的差值来进行模型组间紧密性的比较。

1.2.4 血脑屏障相关基因表达检测:胰蛋白酶消化细胞后收集细胞,使用Trizol法及氯仿分层法分离提取RNA。用cDNA反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA后进行RT-qPCR检测(引物见表1)。结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行相对定量计算。

表1 RT-qPCR检测引物

Table 1 Primers for RT-qPCR

gene	primer sequence (5'-3')
GAPDH	forward: GACAGTCAGCCGCATCTTCT
	reverse: TTAAAAGCAGCCCTGGTGAC
PECAM-1	forward: GAAAGCTGTCCCTGATGCCG
	reverse: GGAGCAGGGCAGGTTCATAA
GLUT-1	forward: TGGCATCAACGCTGTCTTCT
	reverse: CTAGCGCATGGTCATGAGT
PGP	forward: TTGATGCCGTATTCTGGGA
	reverse: TTTGACCCGCATTCAGCTA
LRP-1	forward: TCTGCTTCGTGTGCCTATCC
	reverse: CAGTCATTGTCAATTGTCGCATCT

1.2.5 血脑屏障相关蛋白表达检测:胰蛋白酶消化细胞后收集细胞,制得蛋白样品。166 V恒压进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离蛋白,240 mA恒流进行转膜,后利用相应的抗体进行孵育及处理后显影,检测血脑屏障相关蛋白的表达水平。

1.3 统计学分析

采用 Image J 和 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计学分析,实验数据表示为均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)。两组数据比较使用 *t* 检验进行组间差异分析, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同培养方式的血脑屏障 (BBB) 体外细胞模型的紧密性和通透性变化

半接触细胞共培养模型和全接触细胞共培养模型的紧密性比单培养和双培养以及不接触共培养模型的紧密性明显升高($P<0.01$);与半接触细胞共培养模型相比,全接触细胞共培养模型的紧密性更高($P<0.01$)(图 2A)。与单培养和双培养以及不接触共培养模型相比,半接触和全接触细胞共培养模型具有更低的渗透性($P<0.001$);且全接触细胞共培养模型的渗透性比半接触细胞共培养模型更低($P<0.05$)(图 2B)。

2.2 不同培养方式的血脑屏障 (BBB) 体外细胞模型的相关基因表达差异

BBB 相关的结构基因 *PECAM-1*,在全接触共培养模型中的表达最高($P<0.05$)(图 3A)。BBB 相关的功能基因 *PGP* 和 *LRP-1* 在半接触共培养模型

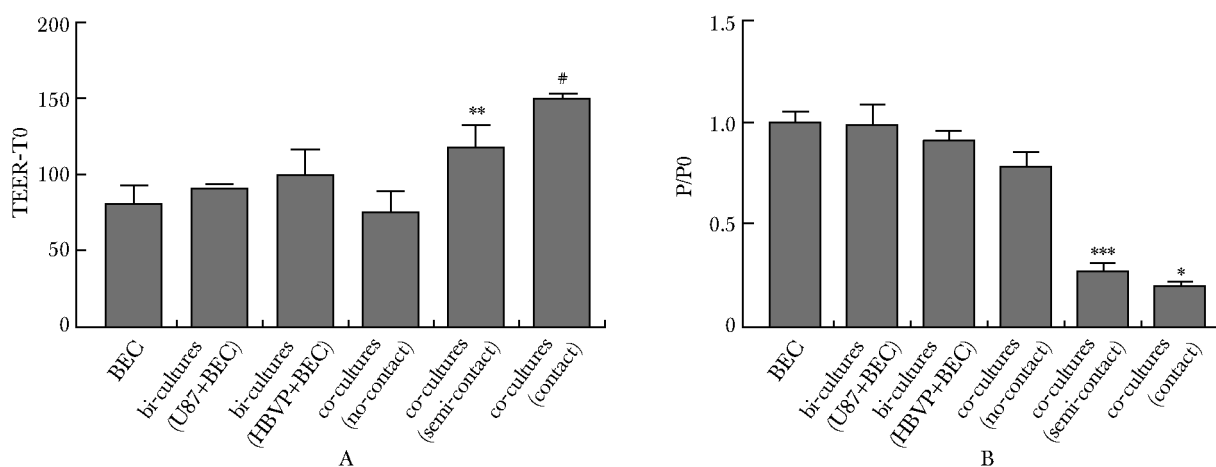
和全接触共培养模型中的表达水平升高($P<0.05$)(图 3B,C)。与其他培养模型相比,BBB 相关功能基因 *GLUT1* 在全接触共培养模型中表现更高的水平($P<0.01$)(图 3D)。

2.3 不同培养方式的血脑屏障 (BBB) 体外细胞模型的相关蛋白表达

结构蛋白 *PECAM-1*、功能蛋白 *GLUT1* 在全接触共培养模型中的表达水平升高($P<0.05$)(图 4A, C)。功能蛋白 *LRP-1* 在半接触共培养和全接触共培养模型中的表达水平升高($P<0.01$)(图 4B)。与单培养模型相比,双培养模型和共培养模型都表现出一定程度的 BBB 相关功能蛋白 P-gp 表达水平的提高,尤其全接触共培养模型表现出较高的 P-gp 表达($P<0.01$)(图 4D)

3 讨论

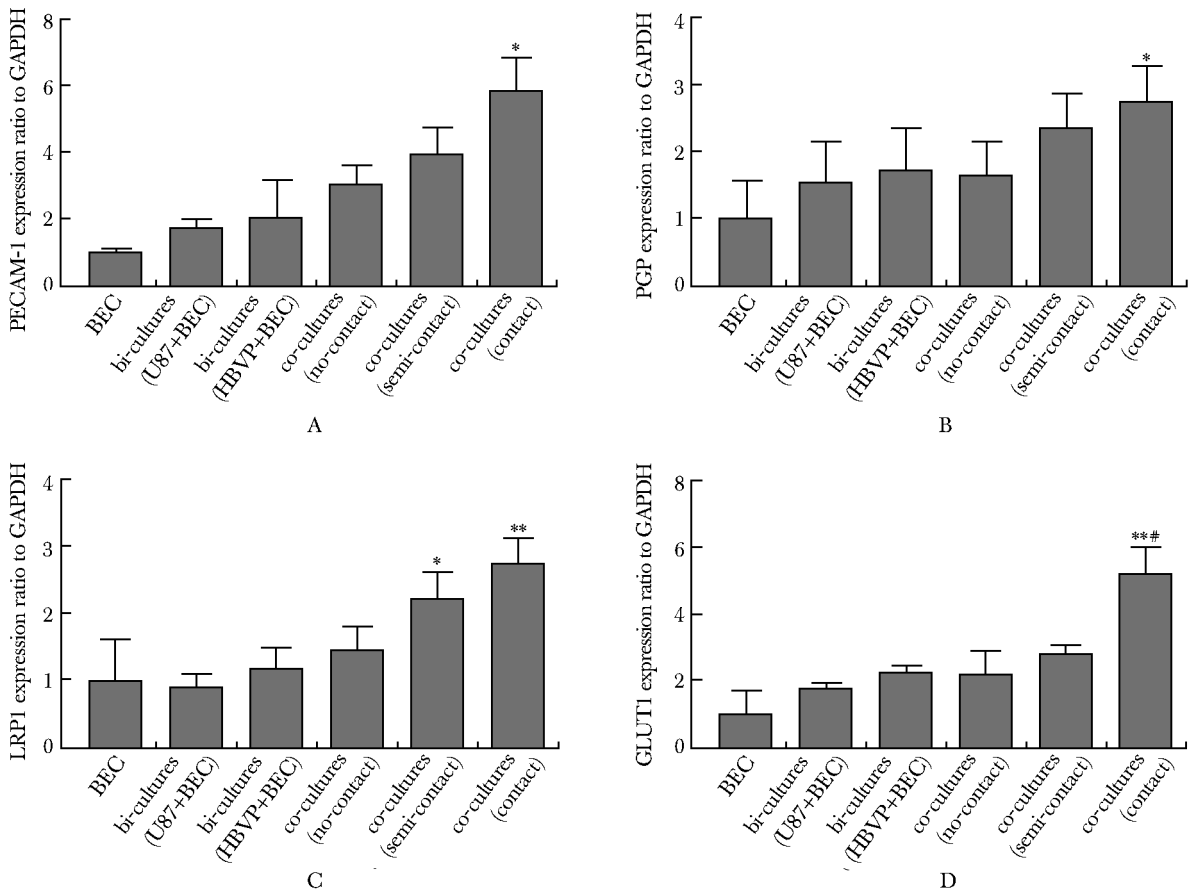
血脑屏障在外周与中枢的物质传递和信息交流中具有重要作用,构建血脑屏障体外模型是研究血脑屏障的重要一环。血脑屏障的性质并不仅仅是内皮细胞自身的性质决定^[8],而是由大脑中的微环境决定的。胶质细胞和周细胞作为血脑屏障的重要组成部分,对血脑屏障的结构以及功能发挥有着重要的作用^[7,9]。全接触共培养模型的紧



TEER, trans-epithelial electrical resistance; T0, TEER of the transwell model without cell; P, permeability; P0, the permeability of the transwell model without cell; the permeability and tightness of the model were determined by the penetration rate of FITC-dextran and the TEER value; BEC, brain endothelial cell; A, TEER of different models; ** $P<0.01$ compared with no-contact co-culture, # $P<0.01$ compared with semi-contact co-culture; B, permeability of different models; * $P<0.05$ compared with semi-contact co-culture, *** $P<0.001$ compared with no-contact co-culture

图 2 不同模型的紧密性和渗透性比较

Fig 2 Comparison of compactness and permeability of different models($\bar{x}\pm s, n=3$)



BEC, brain endothelial cell; A. PECAM-1 mRNA expression in different types of models, * $P < 0.05$ compared with no-contact co-culture; B. P-gp mRNA expression in different types of models, * $P < 0.05$ compared with no-contact co-culture; C. LRP-1 mRNA expression in different types of models, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with no-contact co-culture; D. GLUT1 mRNA expression in different types of models, ** $P < 0.01$ compared with no-contact co-culture, # $P < 0.01$ compared with semi-contact co-culture

图3 不同模型血脑屏障(BBB)中相关基因表达的比较

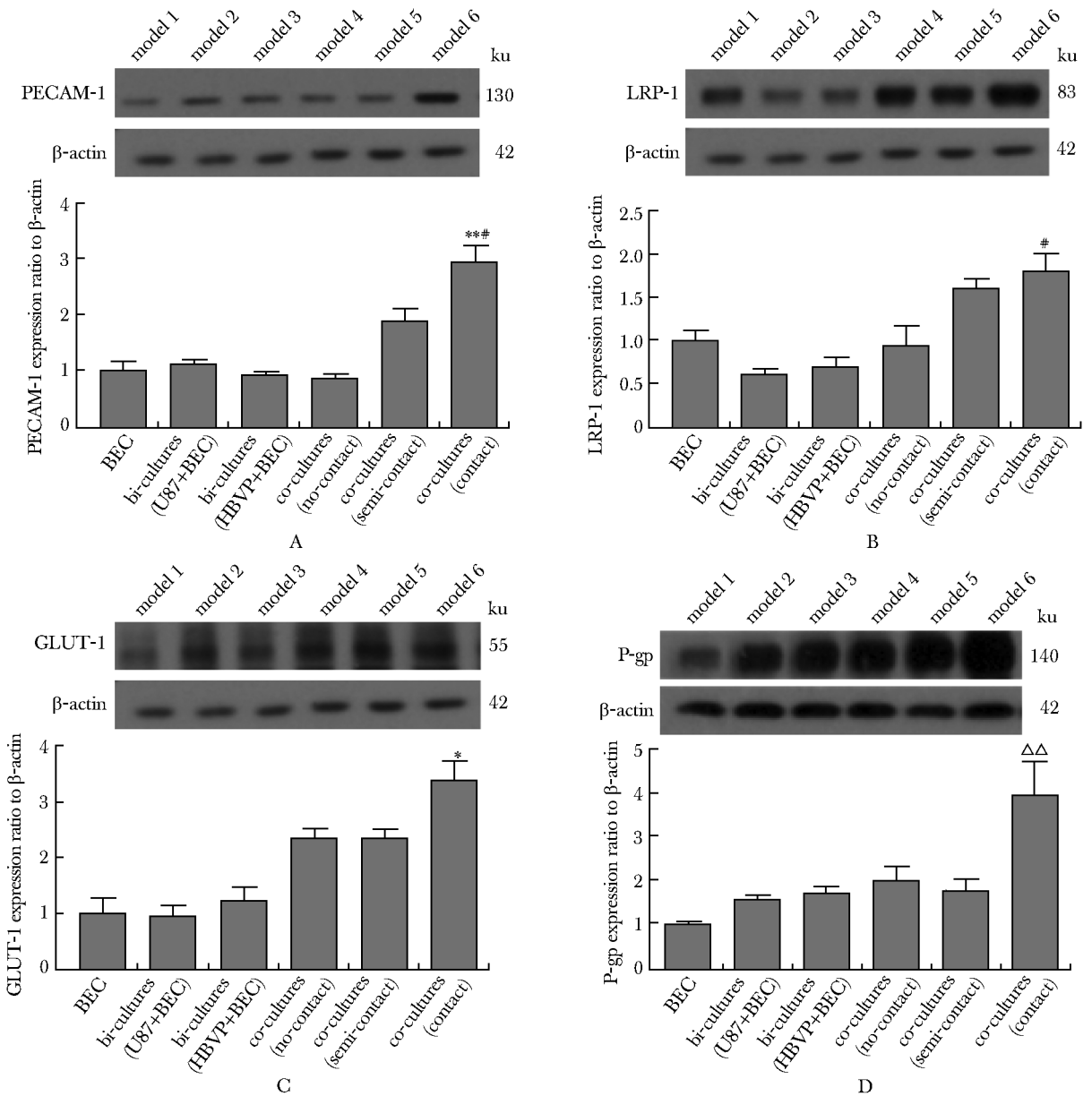
Fig 3 Comparison of expression of BBB-related genes in different models ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

密性最强,反映出周细胞和星形胶质细胞的确能够对血脑屏障的结构生成和功能发挥产生积极影响,而且星形胶质细胞和周细胞不与内皮细胞接触,仅释放某些影响因子在培养基中进而作用于内皮细胞,这种方式对于血脑屏障紧密性的影响并没有直接接触产生的影响更强。相较于其他模型,全接触共培养模型表现出最低的渗透性,即最强的物质屏障功能。对血脑屏障相关结构基因和蛋白PECAM-1的表达水平检测也印证了这一点。

BBB相关的基因和蛋白的表达在全接触模型中的表达都呈现高水平,证明星形胶质细胞和周细胞的存在及细胞之间的相互接触对血脑屏障的功能蛋白和基因的表达产生积极影响。但像P糖

蛋白(P-glycoprotein, P-gp)基因在半接触和全接触共培养模型中都有较高的表达,这可能是因为星形胶质细胞除了通过接触内皮细胞对BBB产生影响外,还可能通过释放因子在培养基中,继而影响BBB的形成,而这种间接作用对内皮细胞这些基因的表达影响比较大。综合来看,全接触共培养血脑屏障体外细胞模型的紧密性更强,渗透性更低,BBB相关的基因和蛋白的表达也水平也更高,是更接近血脑屏障生理状态的体外细胞模型。在接下来的研究中,可以利用这种体外模型探索某些营养物质的输送以及血脑屏障对某些有害物质的阻挡功能。

随着技术的不断发展,血脑屏障模型的建立也在



BEC. brain endothelial cell; A. PECAM-1 expression in different types of models, ** $P < 0.01$ compared with semi-contact co-culture, * $P < 0.001$ compared with no-contact co-culture; B. LRP-1 expression in different types of models, * $P < 0.01$ compared with no-contact co-culture; C. GLUT1 expression in different types of models, * $P < 0.05$ compared with semi-contact co-culture; D. P-gp expression in different types of models, $\Delta\Delta P < 0.01$ compared with BEC (only hCMEC/D3)

图4 不同模型血脑屏障(BBB)相关蛋白表达的比较

Fig 4 Comparison of expression of BBB-related proteins in different models ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

不断地推陈出新。现在模型构建已经向微流控模型和3D模型方向以及干细胞方向^[10]发展。总之,现有实验证明了血脑屏障体外模型作为人类相关疾病

模型的多方面潜力,并有助于器官功能障碍的研究。建立可靠的体外血脑屏障模型可以极大地加快中枢神经系统药物的研发。

参考文献:

[1] Wilhelm I, Fazakas C, Krizbai IA. *In vitro* models of the blood-brain barrier [J]. Acta Neurobiol Exp (Wars),

2011,71;113-128.

[2] Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, et al. Structure

- and function of the blood-brain barrier[J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37:13-25.
- [3] Abbott NJ. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery[J]. *J Inher Metab Dis*, 2013, 36: 437-449.
- [4] Rahman NA, Rasil ANHM, Meyding Lamade U, *et al*. Immortalized endothelial cell lines for *in vitro* blood-brain barrier models; a systematic review [J]. *Brain Res*, 2016, 1642:532-545.
- [5] Van der Helm MW, van der Meer AD, Eijkel JC, *et al*. Microfluidic organ-on-chip technology for blood-brain barrier research[J]. *Tissue Barriers*, 2016, 4: e1142493. doi: 10.1080/21688370.
- [6] Andreone BJ, Lacoste B, Gu C. Neuronal and vascular interactions[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2015, 38:25-46.
- [7] Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier[J]. *Nat Med*, 2013, 19:1584-1596.
- [8] Qosa H, LeVine H 3rd, Keller JN, *et al*. Mixed oligomers and monomeric amyloid- β disrupts endothelial cells integrity and reduces monomeric amyloid- β transport across hCMEC/D3 cell line as an *in vitro* blood-brain barrier model [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842: 1806-1815.
- [9] Armulik A, Genové G, Mäe M, *et al*. Pericytes regulate the blood-brain barrier[J]. *Nature*, 2010, 468:557-561.
- [10] Workman MJ, Svendsen CN. Recent advances in human iPSC-derived models of the blood-brain barrier[J]. *Fluids Barriers CNS*, 2020, 17:30. doi: 10.1186/s12987-020-00191-7.

本刊稿件格式要求(1)

1.1 题名:应与内容相符,言简意赅,体现创新点或主要结论,避免过大、空泛,一般不超过20个汉字,不用副标题。英文题名应与中文一致,除专有名词外,只第1个词的首字母大写,其他均小写。

1.2 基金:在首页页脚标注所受资助的基金项目及编号。

例:基金项目:国家自然科学基金(39470325)。

1.3 作者:应是对文章做出贡献、能对内容负责者,一般 ≤ 7 个。如有不同单位作者,在右上角标注不同数字以区别。通信作者以“*”标注。作者英文的“姓”需用全称并且大写,“名”的第1个字拼音的首字母大写,后面均用小写,两字之间用连字符。

例:WANG Xiao-san。

1.4 作者单位:

1.4.1 中文:写标准全称(由大单位到小单位,中间用空格隔开)、所在省份、城市及邮编。如有不同单位,以作者右上角标的数字对应标注单位。

例:华中科技大学 同济医学院 1. 免疫学系;2. 病理生理学系,湖北 武汉 430022

1.4.2 英文:由小单位到大单位,中间用“,”隔开,省份略去。每个实义词的首字母大写。

例:1. Department of Immunology; 2. Department of Pathophysiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China