

血脑屏障微流控芯片模型的构建及其中药活性成分跨膜转运研究

施艺玮^{1#}, 蔡颖^{2#}, 何晓莉², 洪战英^{1,2*}, 柴逸峰¹

(1. 海军军医大学药理学系, 上海 200433; 2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122)

摘要: 构建血脑屏障微流控芯片模型, 应用于中药活性成分跨血脑屏障渗透性研究。该芯片模型由垂直交叉的两层通道及单层聚碳酸酯膜组成, 采用原代人脑微血管内皮细胞, 并能模拟血管剪切应力。通过活/死细胞染色和免疫荧光染色观察芯片上细胞生长状态, 细胞生长状态良好, 且在动态培养下细胞间黏附连接蛋白结构完整; 考察该芯片模型对荧光示踪剂和3种模型药物的渗透性和P-糖蛋白(P-gp)的表达情况, 结果显示荧光示踪剂和模型药物的渗透性与文献报道一致, 芯片上P-gp表达和功能正常, 表明该血脑屏障芯片模型具有完整的结构和功能。将构建成功的芯片模型应用于6种中药活性成分跨血脑屏障渗透性评价, 采用HPLC-MS/MS法测定跨膜转运液中的药物浓度, 获得各成分的 P_{app} 结果。延胡索甲素 P_{app} 为 $(4.51 \pm 1.90) \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 、延胡索乙素 P_{app} 为 $(9.10 \pm 6.59) \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 、欧前胡素 P_{app} 为 $(9.38 \pm 2.53) \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 而异欧前胡素、黄芩苷和绿原酸浓度低于定量限, 推测其在芯片模型上渗透性较低。本研究成功构建血脑屏障微流控芯片模型, 屏障功能更加完善且更接近生理环境, 有望作为一种新的体外药物渗透性评价工具。

关键词: 血脑屏障; 微流控芯片; 中药活性成分; 药物渗透性; 表观渗透系数

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)03-0802-07

Construction of a blood-brain barrier microfluidic chip model and evaluation of the permeability of active components in traditional Chinese medicine

SHI Yi-wei^{1#}, CAI Ying^{2#}, HE Xiao-li², HONG Zhan-ying^{1,2*}, CHAI Yi-feng¹

(1. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

Abstract: A blood-brain barrier microfluidic chip platform for studying the permeability of active components in traditional Chinese medicine was developed. This model used primary human brain microvascular endothelial cells on a microfluidic chip consisting of two perpendicularly-crossing channels and a single layer porous polycarbonate membrane. The physiological shear stress in the human vasculature was also modeled in this device. Cell viability on the chip was monitored by cell staining and immunofluorescence staining. The cells spread well and the structure of an intercellular adhesion protein was satisfactory. The permeability of fluorescent tracers and three model drugs and the functional expression of P-glycoprotein (P-gp) on the blood-brain barrier were investigated. The results show that the apparent permeability coefficients (P_{app}) of the fluorescent tracers and three model drugs were consistent with those reported in the literature, and P-gp on the chip showed normal function, indicating that there was a complete structure and a functional BBB. The permeability of six active components of traditional Chinese medicine was investigated through this microfluidic chip and the drug concentration was determined

收稿日期: 2021-12-17; 修回日期: 2022-01-17.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872829, 81673386, 82173777).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-21-81871269, E-mail: hongzhy001@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1811

by HPLC-MS/MS to obtain the P_{app} of each component. The P_{app} of corydaline was $(4.51 \pm 1.90) \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, the P_{app} of tetrahydropalmatine was $(9.10 \pm 6.59) \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, and the P_{app} of imperatorin was $(9.38 \pm 2.53) \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$; the concentration of isoimperatorin, baicalin and chlorogenic acid was below the limit of quantification, which suggested that isoimperatorin, baicalin and chlorogenic acid have poor permeability in this BBB chip. This blood-brain barrier microfluidic platform possesses a complete barrier function and near-physiological conditions and could be a valuable *in vitro* tool for drug permeability evaluation.

Key words: blood brain barrier; microfluidic chip; active components in traditional Chinese medicine; drug permeability; apparent permeability coefficient

血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 是位于脑部血管和中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 之间的一道屏障, 维持着 CNS 内环境稳态。BBB 通过紧密连接、黏附连接等结构提供了一个完整的生理屏障。该屏障可以保其免受病原体的侵害, 同样也会阻碍治疗药物进入脑部^[1,2]。目前治疗 CNS 疾病的药物研发效率远远低于其他疾病, 其最主要的原因是大部分有较高的体外生物学效应的药物无法跨 BBB 渗透入脑组织达到有效剂量, 无法进入临床使用。而已获批的治疗 CNS 疾病的药物大多作用于单一靶点, 且伴有不良反应^[3,4]。中药具有多成分, 可作用于多靶点的特点备受关注^[5-7]。文献报道, 中药活性成分可以抑制神经毒性和氧化应激损伤^[8], 抑制细胞增殖和凋亡, 促进血管生成, 修复神经生长等^[9], 但由于中药活性成分溶解度和渗透性低, 且其渗透行为又往往受药材中其他成分影响^[10-12]。因此有必要研究中药跨 BBB 行为, 为中药治疗 CNS 疾病提供可靠的科学依据。

目前, 动物模型、平行人工膜渗透性分析和 Transwell 模型是研究 BBB 的常用模型。动物模型被认为是研究 BBB 和相关 CNS 疾病的标准模型, 但仍然难以将针对动物模型的结论运用于人体。体外 BBB 模型更容易控制和量化, 但由于缺乏 BBB 微环境, 因此也难以获得准确数据。近年来, BBB 微流控芯片模型已逐渐应用于体外研究 CNS 疾病的发病机制、药物渗透性评价以及新药筛选^[13-17]。相比于传统 Transwell 模型, BBB 微流控芯片模型可以模拟体内 BBB 的基本生理结构和功能, 通过还原脑血管微环境, 生理流体流动, 以可控的方式再现体内微环境。基于以上优势, 本研究建立 BBB 微流控芯片模型评价靶向 CNS 的中药活性成分跨膜转运, 对中药的开发和临床应用具有重要意义。本实验建立了一种简单可行的 BBB 微流控芯片模型, 评估 6 种中药活性成分跨 BBB 转运的特征, 并与传统模型的结果进行比较。

材料与方法

药品与试剂 多柔比星 (doxorubicin)、咖啡因

(caffeine)、西咪替丁 (cimetidine)、欧前胡素 (imperatorin)、异欧前胡素 (isoimperatorin)、延胡索甲素 (corydaline)、延胡索乙素 (tetrahydropalmatine)、黄芩苷 (baicalin)、绿原酸 (chlorogenic acid)、磺胺甲噁唑 (sulfamethoxazole, 内标), 中国食品药品检定研究院; 荧光素钠 (fluorescein sodium, NaFL)、罗丹明 123 (3,6-diamino-9-[2-(methoxycarbonyl)phenyl]xanthylum chloride)、Tariquidar, 大连美仑生物有限公司; 内皮细胞培养基 (endothelial cell medium, ECM), 美国 ScienCell 公司; Hank's 平衡盐溶液 (Hanks' balanced salt solution, HBSS), 美国 Gibco 公司; SU-8 2075 光刻胶, 美国 Microchem 公司; 硅单面抛光片、显影液, 苏州汶颢芯片科技有限公司; 聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 预聚剂、固化剂, 美国 Dow Corning 公司; 血管内皮钙黏蛋白 (VE-cadherin) 兔多克隆抗体、抗兔 IgG (H+L) (连接 488 荧光基团), 英国 Abcam 公司; 多聚甲醛、Triton X-100、牛血清白蛋白、DAPI 染色液, 碧云天生物科技公司; MTT 细胞毒性检测试剂盒 (MTT 溶液和 formazan 溶解液), 大连美仑生物有限公司; FITC 标记的多聚糖 70 kDa (70 kDa fluorescein isothiocyanate-labelled dextran, FITC-dextran 70 kDa)、IV 型胶原蛋白、3-氨基三乙氧基硅烷, 美国 Sigma-Aldrich 公司; Live/Dead 试剂, 美国 Thermo Fisher 公司; 聚碳酸酯 (polycarbonate, PC) 膜 (孔径 0.4 μm), 英国 Whatman 公司; 10 \times 多聚赖氨酸, 北京索莱宝科技有限公司。

细胞培养 原代人脑微血管内皮细胞 (human brain microvascular endothelial cell, hBMEC, 美国 ScienCell 公司) 用 ECM 培养, 取对数生长期细胞用于实验。

MTT 法检测细胞毒性 消化 hBMEC 细胞, 按照每孔 5 000 个接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 24 h 后加入用培养基倍比稀释成不同浓度的药物溶液, 咖啡因 (2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、西咪替丁 (1.0、2、4、8、16 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、多柔比星 (2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、欧前胡素 (0.625、1.5、3、6、12 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、异欧前胡素 (0.625、1.5、3、6、12 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、延胡索甲素 (0.625、

1.5、3、6、12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、延胡索乙素 (0.625、1.5、3、6、12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、黄芩苷 (0.625、1.5、3、6、12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、绿原酸 (0.625、1.5、3、6、12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。孵育 3 h 后, 每孔加入 10 μL MTT, 孵育 4 h 后加入 100 μL 的 Formazan 溶解液, 继续孵育 2 h 后使用酶标仪测定其在 562 nm 处吸光度值。存活率 = [(实验组吸光度 - 空白孔吸光度) / (对照组吸光度 - 空白孔吸光度)] \times 100%。

微流控芯片的设计与制作 BBB 芯片设计由通道垂直交叉的两层 PDMS 组成, 其中聚碳酸酯膜将上下两层分隔开 (图 1)。芯片通道高 200 μm , 培养腔宽度为 2 mm。孔径为 0.4 μm 的半透性多孔聚碳酸酯膜分隔上下层培养腔, 在上层培养腔液体注入口连接注射泵, 控制流速为 400 $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ 使细胞受到约为 1 Pa 的生理剪切应力^[18]。芯片采用标准软光刻技术制作而成。具体步骤如下: 使用 AutoCAD 按同等比例绘制芯片结构图样, 打印至菲林膜, 硅片清洗干净后烘干备用, 于硅片中间倒上适量 SU-2075 光刻胶甩胶。甩胶结束后, 于 95 $^{\circ}\text{C}$ 热板上热烘 45 min。测定硅片上光刻胶厚度, 待芯片通道高度到 200 μm , 根据光强调整曝光时间, 将硅片、掩模依次置于光刻机中央曝光, 曝光后的硅片于 95 $^{\circ}\text{C}$ 热板上热烘 15 min, 利用显影液对曝光后的硅片快速旋转振荡显影 10~15 min, 显影完成后使用显影液对硅片表面淋洗吹干。将 PDMS 预聚剂和固化剂 (10:1, v/v) 混合均匀后浇注到模板上, 真空脱气 2 h 以排除气泡, 将脱气后的芯片置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱内固化 2 h, 将固化的 PDMS 揭开, 打孔, 异丙醇超声清洗表面。使用 5% 的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 80 $^{\circ}\text{C}$ 处理聚碳酸酯膜 30 min。将表面等离子化处理的 PDMS 与聚碳酸酯膜键合, 立即形成不可逆键合, 将上述带膜的 PDMS 与另一个空白 PDMS 经过表面等离子化处理后键合。

芯片预处理 芯片使用之前使用高压高温灭菌处

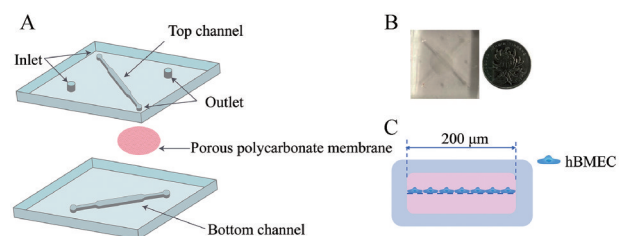


Figure 1 Schematic illustrations of the microfluidic chip. A: Microfluidic models. Three-dimensional schematic depicting the microfluidic device fabrication. The top and bottom layers form two perpendicularly-crossing channels. A porous polycarbonate membrane is embedded at the intersection of the crossing channels for cell culture. B: A photo of the microfluidic device compares to a Chinese yuan coin. C: The side view of the microfluidic device. hBMVEC: Human brain microvascular endothelial cell

理, 烘干备用。将 10 \times 多聚赖氨酸在灭菌水中稀释十倍后, 加入芯片通道 30 min 修饰通道内表面, 灭菌水清洗 3 次, 每次 5 min, 烘干备用。接种细胞前, 使用 IV 型胶原 (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 包被聚碳酸酯膜 4 h 后, 用培养基冲洗去除通道内多余胶原。

血脑屏障芯片模型的构建 hBMVEC 细胞按照浓度为 10⁶·mL⁻¹, 吸取细胞悬液注入芯片上层通道, 置于细胞培养箱中培养, 每 24 h 更换培养基, 第三天连接注射泵以 400 $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ 向芯片上层通道通入培养基进行动态培养。

血脑屏障芯片模型细胞活性评价 根据使用说明书配制 Live/Dead 染色工作液, PBS 洗涤培养腔中 hBMVEC 细胞, 向培养腔中加入工作液, 避光孵育 20 min 后, 荧光显微镜观察。

血脑屏障芯片模型的屏障结构评价 去除芯片内细胞培养基, 用 PBS 漂洗; 加入 4% 的多聚甲醛在室温静置固定通道内细胞 10 min, PBS 洗涤; 使用 0.1% Triton X-100 透化细胞 5 min, PBS 洗涤。用 5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h, 然后用 PBS 洗涤; 使用兔抗 VE-cadherin 一抗 (1:400) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 用 PBS 漂洗去除残留一抗, 然后用带有抗兔 IgG (H+L) (连接 488 荧光基团) (1:1 000) 室温避光孵育 1 h, 用 PBS 漂洗去除残留的二抗后, 加入 DAPI 室温避光染色 3 min, PBS 漂洗后置于荧光显微镜下拍照。

血脑屏障芯片模型的屏障选择性评价 注射器分别吸取 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的荧光素钠 (NaFL) 溶液和 HBSS 缓冲溶液通过注射泵分别以 400 $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速灌入上层培养腔和下层培养腔。下层培养腔的溶液每隔 30 min 收集 100 μL 在多功能酶标仪上测定荧光强度 ($E_x = 485 \text{ nm}$, $E_m = 530 \text{ nm}$), 再根据标准曲线将测得的荧光强度转换成浓度。1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 FITC 标记的多聚糖 70 kDa 工作溶液通过注射泵通入 BBB 培养腔中, 其渗透率测定方法同上。渗透率计算公式为:

$$P_{\text{app}} = C(t)V / (C_0 A \Delta T) \quad (1)$$

其中 P_{app} 是表观渗透系数, C_0 是上层培养腔的示踪剂浓度, $C(t)$ 是从上层培养腔渗透到下层培养腔的示踪剂的浓度, V 是下层培养腔的液体体积, A 是上层培养腔与下层培养腔交界处的面积 (4 mm^2), ΔT 是渗透时间。

血脑屏障芯片模型 P-gp 功能评价 芯片上下通道内加入 HBSS 缓冲溶液孵育 30 min。配制浓度分别为罗丹明 123 溶液 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 Tariquidar 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HBSS 工作液。吸收: 通过注射泵以 400 $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速分别于上层培养腔灌入罗丹明 123 + Tariquidar 溶液和罗丹明 123 溶液作为供给液, 下层灌入空白 HBSS 溶

液, 分别于 30、60、90 和 120 min 从下层培养腔收集液中吸取 100 μL 液体, 酶标仪测量各时间点荧光强度。外排: 通过注射泵以 400 $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ 分别于下层培养腔灌入罗丹明 123 + Tariquidar 溶液和罗丹明 123 溶液作为供给液, 上层培养腔灌入空白 HBSS 缓冲溶液, 同上时间从上层培养腔收集液中吸取 100 μL 液体, 测量各时间点荧光强度。然后按公式 1 计算罗丹明 123 吸收 (AP-BL)、外排 (BL-AP) 的渗透率 ($P_{\text{app AP-BL}}$, $P_{\text{app BL-AP}}$) 以及外排率 (ER), 验证屏障功能。外排率计算公式:

$$\text{ER} = P_{\text{app BL-AP}} / P_{\text{app AP-BL}} \quad (2)$$

血脑屏障芯片模型上药物渗透性实验 通过细胞毒性实验选取药物浓度分别为, 咖啡因浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、西咪替丁 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、多柔比星 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、延胡索甲素、延胡索乙素、欧前胡素、异欧前胡素、黄芩苷和绿原酸 (3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 进行渗透性实验。培养腔中加入 HBSS 缓冲溶液培养 30 min; 取注射器分别吸取 1 mL 药物溶液、1 mL HBSS。注射泵以 400 $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速将药物溶液灌入上层培养腔, 将 HBSS 以 400 $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ 灌入下层培养腔, 每隔 30 min 收集 200 μL 下层通道溶液。将收集到的溶液进行定量分析, 按公式 1 计算 P_{app} 。

传统 Transwell 模型的构建与药物渗透性实验 当 hBMEC 细胞生长至融合度至 80%, 将细胞消化制备单细胞悬液, 将 hBMEC 按照细胞密度为每毫升 3×10^5 个接种于 Transwell 培养板的 AP 侧, 每孔接种 0.5 mL 的细胞悬液, hBMEC 细胞贴附于 Transwell 小室 AP 侧, 形成 BBB-on-Transwell 模型。于第 1、2、3、5、7 和 9 天测定空白组和实验组的跨膜电阻值 (TEER), 待 TEER 值最高时进行后续渗透性实验。将 AP 侧置换为 0.5 mL 药物溶液, BL 侧置换为 1.5 mL 空白 HBSS 缓冲溶液作为接收液。于 30、60、90、120 和 150 min 不同时间点从 BL 侧吸取 100 μL 液体, 同时补加 100 μL 空白 HBSS 缓冲溶液, 样品预处理后测定其浓度。

HPLC-MS/MS 定量测定转运液中的药物浓度 采用美国 Agilent 公司 1260 型高效液相色谱仪, 配备高压泵、自动进样器、脱气机、柱温箱等, 以及 6470 型三重四极杆质谱仪。色谱条件: Waters XBridge BEH-C18 (2.1 mm \times 100 mm, 2.5 μm) 色谱柱; 流速: 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量: 1 μL ; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液; B 相为乙腈溶液。采用梯度洗脱方法: 0~1.5 min, A (%) 95; 1.5~1.7 min, A (%) 95~30; 1.7~4 min, A (%) 30。因 0~1.5 min 内无待测物质出峰, 故在此期间将液体经六通阀排出至废液, 同时防止样品可能携带无机盐污染离子源。质谱条件: 离子源为电喷雾电离 (ESI); 干燥气温度为 350 $^{\circ}\text{C}$; 干燥气流量为 11 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; 雾化气压力为 40 psi (1 psi \approx 6.9 kPa); 毛细管电压为

4 000 V (+)、3 500 V (-); 鞘气流量为 11 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; 喷嘴电压为 500 V。扫描模式采用多反应监测模式 (MRM), 各目标化合物及内标的质谱参数设置如表 1 所示。

Table 1 Optimal parameters for MS of nine drugs and internal standard. MS: Mass spectrometry. M_r : Relative molecular mass; Frag: Fragment voltage; CE: Collision energy; IS: Internal standard

Analyte	M_r	m/z		Frag /V	CE /eV	Polarity
		Precursor ion	Product ion			
Caffeine	194.19	195.1	138.1	100	20	Positive
Cimetidine	252.34	253.1	159.0	95	13	Positive
Doxorubicin	543.52	544.1	397.0	120	12	Positive
Imperatorin	270.28	271.1	202.9	95	8	Positive
Isoimperatorin	270.28	271.1	202.8	100	10	Positive
Corydaline	369.44	370.2	192.1	115	30	Positive
Tetrahydropalmatine	355.42	356.2	192.1	100	25	Positive
Baicalin	446.37	445.0	268.9	100	10	Negative
Chlorogenic acid	354.31	353.2	191.2	85	10	Negative
Sulfamethoxazole (IS)	253.05	254.0	155.8	100	13	Positive
Sulfamethoxazole (IS)	253.05	252.6	156.0	80	10	Negative

储备液配制 精密称量咖啡因和多柔比星各 10 mg, 分别加入去离子水定容至 10 mL 得到浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液; 精密称量西咪替丁、欧前胡素、异欧前胡素、延胡索甲素、延胡索乙素、黄芩苷、绿原酸、磺胺甲噁唑 (IS) 对照品各 10 mg, 分别加入甲醇定容至 10 mL, 得到储备液浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

工作溶液和质量控制样品 (QC) 配制 分别精密量取上述 9 个药物储备液适量, 加入甲醇按比例稀释得到系列工作溶液。分别精密量取适量工作溶液至容量瓶中, 加入甲醇分别得到低、中、高 3 个不同浓度的 QC 工作溶液。取磺胺甲噁唑储备液适量, 甲醇稀释为 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标工作溶液。

样品预处理 取 100 μL 样品与 20 μL 内标溶液, 涡旋 3 min, 混匀, 于 15 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 取上清进行分析。

结果

1 药物对 hBMEC 细胞的毒性

不同浓度的药物作用于 hBMEC 细胞后, 细胞活性结果发现在测试浓度范围内, 所有药物对 hBMEC 细胞几乎不产生毒性, 选择细胞活力较高的药物浓度进行后续的渗透性实验。选择浓度为咖啡因 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、西咪替丁 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、多柔比星 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、欧前胡素、异欧前胡素、延胡索甲素、延胡索乙素、黄芩苷、绿原酸为 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 进行药物的渗透性实验。

2 HPLC-MS/MS 方法学验证

3 个模型药物多柔比星、咖啡因、西咪替丁以及 6 个

中药成分欧前胡素、异欧前胡素、延胡索甲素、延胡索乙素、黄芩苷和绿原酸在各自浓度下线性良好,具体线性范围、回归方程及相关的参数如表2所示。

分别测定3种模型药物和6个中药活性成分低、中、高QC样品的精密度、准确度,结果显示上述药物的日内精密度和日间精密度均低于15%,准确度在80%~120%,该方法精密度、准确度良好,符合定量测定要求。

3 血脑屏障芯片结构完整性评价

使用Live/Dead试剂观察芯片上hBMEC细胞的活性以及融合程度。结果显示静态培养三天hBMEC细胞形成较为疏松的细胞单层(图2A)。细胞培养第五天,即动态培养两天之后,hBMEC细胞间相对更加紧密(图2B),且hBMEC细胞在芯片上存活率较高。实验考察了BBB上一种重要的黏附连接蛋白VE-cadherin的表达情况,以评价该芯片中BBB的紧密型,该蛋白可以调节BBB的功能,且其结构和功能异常会导致血管内皮细胞黏附连接的解离^[19,20]。对hBMEC细胞间黏附连接蛋白VE-cadherin蛋白进行免疫荧光染色,观察细胞融合情况。结果显示,VE-cadherin蛋白勾勒出细胞的轮廓,结果显示hBMEC细胞单层形成了紧密的细胞连接,具有完整的BBB结构(图2C)。

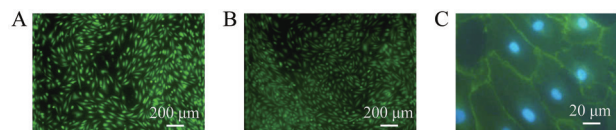


Figure 2 Cell culture on chip. A: The live/dead assay of hBMECs on chip on Day 5; B: The live/dead assay of hBMECs on chip on Day 7. Representative images showing the cell morphology and viability of hBMECs (green) in culture channels incubating under static culture for 3 days (Day 1–3) and then dynamic culture for 4 days (Day 4–7); C: Immunostaining of hBMECs used on chip in this study. Cells were fixed and stained with antibodies targeting VE-cadherin and conjugated to Fluor 488 (green), and counterstained with nuclear stain (blue). Cells strongly expressed the tight junctions as indicated by the VE-cadherin

4 血脑屏障芯片功能完整性评价

实验考察了该芯片模型对荧光素和3种模型药物的渗透性情况。荧光素钠NaFL和不同分子量的FITC-葡聚糖(4、10、40和70 kDa)被广泛用于评估渗透性。该芯片模型中NaFL和FD70相应的 P_{app} 分别为 $(3.35 \pm 1.61) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 和 $(1.85 \pm 0.85) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。传统Transwell模型中NaFL的 P_{app} 为 $(4.12 \pm 0.84) \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。芯片上NaFL和FITC-葡聚糖的低渗透性与已报道的体内数据相关^[21]。芯片模型中荧光示踪剂渗透系数明显低于传统Transwell模型,说明该芯片模型形成的屏障更为紧密。

考察高、中、低不同渗透性的3种小分子药物咖啡因、西咪替丁和多柔比星跨BBB渗透情况,芯片模型中这3种药物的 P_{app} 分别为:咖啡因 P_{app} 为 $(6.76 \pm 4.64) \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 、西咪替丁 P_{app} 为 $(3.67 \pm 2.63) \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 、多柔比星 P_{app} 为 $(1.42 \pm 1.14) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ (图3A)。芯片上3种模型药物的渗透性高、中、低趋势与文献^[22]报道基本一致。表3总结了芯片模型与传统Transwell模型中荧光示踪剂和3种模型药物的渗透性。芯片模型中荧光示踪剂和3种模型药物的渗透系数与体内数据具有一定的相关性,表明该模型建立了近生理的高度选择性BBB。

罗丹明123是P-gp的典型底物,广泛用于P-gp功能研究。Tariquidar是一种特异性较强的P-gp抑制剂,实验结果发现,加入P-gp抑制剂Tariquidar后罗丹明123吸收量增加、外排量降低,芯片模型中不加抑制剂罗丹明123外排率为 2.03 ± 0.50 ,加入抑制剂后外排率降低至 1.05 ± 0.14 ;Transwell模型中不加抑制剂罗丹明123外排率为 1.75 ± 0.06 ,加入抑制剂后外排率降低至 1.32 ± 0.15 (图3B)。与Transwell模型相比,芯片模型同样显示出P-gp功能,说明P-gp在芯片模型中稳定表达且对药物具有明显的外排作用。

5 血脑屏障芯片模型中药物渗透性评价

本研究选择了文献中已报道的6种潜在治疗CNS疾病的中药活性成分,分别是延胡索甲素、延胡索乙

Table 2 Calibration curves of model drugs and six components in TCM. TCM: Traditional Chinese medicine; LLOQ: Lower limit of quantification

Analytes	Calibration curve	Weighting	Linear range/ng·mL ⁻¹	r ²	LLOQ/ng·mL ⁻¹
Doxorubicin	$Y = 0.0003X + 0.0003$	$1/X^2$	2–200	0.9989	2
Caffeine	$Y = 0.0051X + 0.0001$	$1/X^2$	0.5–1000	0.9997	0.5
Cimetidine	$Y = 0.0550X - 0.0035$	$1/X^2$	0.1–600	0.9999	0.1
Imperatorin	$Y = 0.0372X + 0.0059$	$1/X^2$	1–200	0.9980	1
Isoimperatorin	$Y = 0.0875X + 0.0012$	$1/X^2$	0.01–125	0.9990	0.01
Corydaline	$Y = 0.1126X - 0.0122$	$1/X^2$	0.5–150	0.9944	0.5
Tetrahydropalmatine	$Y = 0.1573X - 0.0041$	$1/X^2$	0.15–200	0.9952	0.15
Baicalin	$Y = 0.5620X - 2.0655$	$1/X^2$	5–60	0.9957	5
Chlorogenic acid	$Y = 1.7303X - 7.6605$	$1/X^2$	5–60	0.9970	5

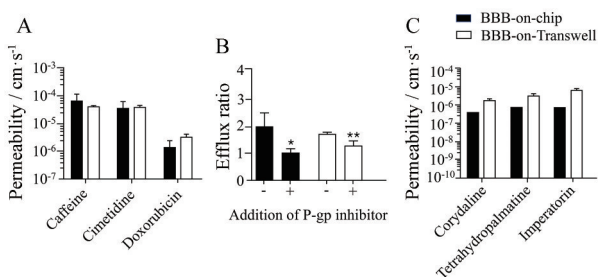


Figure 3 Permeability and function of P-gp on microfluidic chip. A: Permeability coefficients of three model drugs in BBB-on-chip and BBB-on-Transwell. Data is presented in Table 1 according to the *in vivo* data. B: P-gp activities measured as efflux ratio in the BBB-on-Chip ($^*P < 0.05$ vs corresponding control group) versus BBB-on-Transwell ($^{**}P < 0.05$ vs corresponding control group). C: Permeability coefficients of corydaline, tetrahydropalmatine and imperatorin in BBB-on-chip and BBB-on-Transwell. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. BBB: Blood-brain barrier. P-gp: P-glycoprotein

Table 3 Comparison of permeability of BBB-on-chip and BBB-on-Transwell ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$). P_{app} : Apparent permeability coefficient; NaFL: Fluorescein sodium; FD 70: Fluorescein isothiocyanate-labelled dextran 70 kDa

Compound	$P_{app}/\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$	
	BBB-on-chip	BBB-on-Transwell
NaFL	$(3.35 \pm 1.61) \times 10^{-6}$	$(4.12 \pm 0.84) \times 10^{-5}$
FD 70	$(1.85 \pm 0.85) \times 10^{-6}$	-
Caffeine	$(6.76 \pm 4.64) \times 10^{-5}$	$(4.17 \pm 0.20) \times 10^{-5}$
Cimetidine	$(3.67 \pm 2.06) \times 10^{-5}$	$(4.06 \pm 0.32) \times 10^{-5}$
Doxorubicin	$(1.42 \pm 1.34) \times 10^{-6}$	$(3.26 \pm 0.80) \times 10^{-6}$

素、欧前胡素、异欧前胡素、黄芩苷和绿原酸, 渗透系数呈高、中、低趋势^[23]。在所构建的芯片模型上对这6种中药活性成分跨BBB转运进行评估, 采用HPLC-MS/MS法测定各成分的含量, 求得相应的 P_{app} , 结果表明延胡索甲素 P_{app} 为 $(4.51 \pm 1.90) \times 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ 、延胡索乙素 P_{app} 为 $(9.10 \pm 6.59) \times 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ 、欧前胡素 P_{app} 为 $(9.38 \pm 2.53) \times 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, 而异欧前胡素、黄芩苷和绿原酸浓度低于定量限(图3C), 推测异欧前胡素、黄芩苷和绿原酸在芯片模型上渗透性较差。表4总结了芯片模型与传统Transwell模型中几种中药活性成分的渗透性。通过Transwell模型验证发现, 芯片模型中药物渗透系数结果与其高度相关, 但芯片模型中药物渗透系数普遍低于传统Transwell模型, 表明动态培养微流控芯片模型中BBB具有更佳的屏障功能, 更适用于药物跨BBB转运研究。几种活性成分的渗透趋势与荧光示踪剂和模型药物的低渗透性高度相关。芯片模型中屏障功能优于Transwell模型的主要原因是hBMEC在动态培养条件下细胞生长状态更佳, 且在流体剪切应力

Table 4 Permeability coefficients of six active components of TCM in BBB-on-chip and BBB-on-Transwell ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

Compound	$P_{app}/\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$	
	BBB-on-chip	BBB-on-Transwell
Imperatorin	$(9.38 \pm 2.53) \times 10^{-7}$	$(8.40 \pm 0.73) \times 10^{-6}$
Isoimperatorin	-	$(1.69 \pm 0.06) \times 10^{-6}$
Corydaline	$(4.51 \pm 1.90) \times 10^{-7}$	$(2.34 \pm 0.37) \times 10^{-6}$
Tetrahydropalmatine	$(9.10 \pm 6.59) \times 10^{-7}$	$(4.16 \pm 0.56) \times 10^{-6}$
Baicalin	-	-
Chlorogenic acid	-	-

下内皮细胞间紧密连接蛋白和功能蛋白表达正常。

讨论

本研究采用原代脑微血管内皮细胞结合微流控芯片技术, 建立体外高保真BBB微流控芯片模型, 用于评价中药活性成分跨BBB的渗透行为。对所构建的BBB芯片模型从三个方面进行BBB结构和功能的评价: ① 芯片上细胞生长状况; ② 荧光示踪剂和3种模型药物(咖啡因、西咪替丁、阿霉素)的渗透性; ③ BBB上P-gp蛋白功能, 结果显示所构建的芯片模型能较好的模拟BBB结构和功能。

采用成功设计的BBB微流控芯片, 本研究考察了6种CNS靶向中药活性成分(欧前胡素、异欧前胡素、延胡索甲素、延胡索乙素、黄芩苷、绿原酸)的渗透性行为, 相比Transwell模型, 微流控芯片模型具有更低的渗透率, 结合屏障上细胞状态及紧密连接蛋白结构和屏障上功能蛋白功能表达情况, 以及近生理状态的流体剪切应力, 可以推断本文所构建的体外BBB芯片模型具有更佳的屏障结构与功能, 更适用于评价药物跨BBB转运。

近年来, 器官芯片技术在细胞生物学领域逐渐兴起, 涌现出一些模拟人体BBB结构和功能的芯片, 但多数结构较复杂、制作要求高、稳定性和重现性不佳。本实验所构建的BBB芯片模型有以下优点: 一是设计简单且结合人脑微血管内皮细胞单培养, 芯片从制作到使用都较为简便且贴近人体生理特征; 二是该芯片中BBB结构平面化, 便于观察芯片上细胞生长状态及病理变化, 可用于BBB对外界刺激物反应实时观察研究, 该芯片相比于体内及其他体外细胞模型而言具有可视化的优点; 三是通过精确控制流体的流速得以重现体内流体剪切应力, 在微通道中流动的流体影响细胞生长、形态和BBB结构, 施加生理水平的剪切应力有利于增加紧密连接蛋白的表达, 增强屏障功能; 四是所制作的芯片中BBB功能区域较小, 有利于后续在芯片上集合多功能区域, 实现芯片上高通量实验。

综上所述, 本研究所构建的 BBB 微流控芯片模型以原代人脑微血管内皮细胞的动态培养, 形成一个近人体生理环境的体外 BBB 微环境的芯片模型, 为中药活性成分跨 BBB 转运研究提供了一个新颖的平台, 并且有望通过芯片功能单元的复制实现高通量药物筛选。目前, 本模型仅用于 BBB 渗透研究, 后续可以通过改变细胞模型模拟其他器官功能单元, 同样也可以将 BBB 功能单元汇聚于人体多器官芯片中, 发挥 BBB 功能。

作者贡献: 施艺玮、蔡颖负责实验设计、实验开展及论文撰写; 何晓莉负责修改文章; 洪战英负责实验设计、指导写作、修改及校对文章; 柴逸峰负责审阅文章。

利益冲突: 本文无利益冲突。

References

- [1] Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, et al. Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier [J]. *Cell*, 2015, 163: 1064-1078.
- [2] Langen UH, Ayloo S, Gu C. Development and cell biology of the blood-brain barrier [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2019, 35: 591-613.
- [3] Gribkoff VK, Kaczmarek LK. The need for new approaches in CNS drug discovery: why drugs have failed, and what can be done to improve outcomes [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 120: 11-19.
- [4] Howes MR, Fang R, Houghton PJ. Effect of Chinese herbal medicine on Alzheimer's disease [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2017, 135: 29-56.
- [5] Tao W, Zhang H, Xue W, et al. Optimization of supercritical fluid extraction of oil from the fruit of *Gardenia jasminoides* and its antidepressant activity [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2014, 19: 19350-19360.
- [6] Wang HQ, Liu M, Wang L, et al. Identification of a novel BACE1 inhibitor, timosaponin A-III, for treatment of Alzheimer's disease by a cell extraction and chemogenomics target knowledge-guided method [J]. *Phytomedicine*, 2020, 75: 153244.
- [7] Meng Q, Wang A, Hua H, et al. Intranasal delivery of huperzine A to the brain using lactoferrin-conjugated *N*-trimethylated chitosan surface-modified PLGA nanoparticles for treatment of Alzheimer's disease [J]. *Int J Nanomed*, 2018, 13: 705-718.
- [8] Yang X, Wei HM, Hu GY, et al. Combining antioxidant astaxanthin and cholinesterase inhibitor huperzine A boosts neuroprotection [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21: 1043-1050.
- [9] Sun K, Fan J, Han J. Ameliorating effects of traditional Chinese medicine preparation, Chinese materia medica and active compounds on ischemia/reperfusion-induced cerebral microcirculatory disturbances and neuron damage [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5: 8-24.
- [10] Zhang YN, Yang YF, Yang XW. Blood-brain barrier permeability and neuroprotective effects of three main alkaloids from the fruits of *Euodia rutaecarpa* with MDCK-pHaMDR cell monolayer and PC12 cell line [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98: 82-87.
- [11] Wu L, Luo YM, Liang BW, et al. Effect of compatibility of Paeoniae Radix Alba and Aconiti Radix Cocta on transdermal permeation role of paeoniflorin [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2015, 21: 1-4.
- [12] Li T, Zhao XL, Nie YL, et al. UHPLC quantification and brain permeability study of sinomenine and ligustrazine in CQM after single intravenous administration [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 2308-2315.
- [13] Campisi M, Lim SH, Chiono V, et al. 3D self-organized human blood-brain barrier in a microfluidic chip [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2258: 205-219.
- [14] Tricinci O, De Pasquale D, Marino A, et al. A 3D biohybrid real-scale model of the brain cancer microenvironment for advanced *in vitro* testing [J]. *Adv Mater Technol*, 2020, 5: 2000540.
- [15] Peng B, Tong Z, Tong WY, et al. *In situ* surface modification of microfluidic blood-brain-barriers for improved screening of small molecules and nanoparticles [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 56753-56766.
- [16] Thakur A, Sidu RK, Zou H, et al. Inhibition of glioma cells' proliferation by doxorubicin-loaded exosomes *via* microfluidics [J]. *Int J Nanomed*, 2020, 15: 8331-8343.
- [17] Cai Y, Chen Y, Zhou WT, et al. Research advancement in the construction and applications of microfluidic devices for *in vitro* blood-brain barrier research [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 269-280.
- [18] Prabhakarandian B, Shen MC, Nichols JB, et al. SyM-BBB: a microfluidic blood brain barrier model [J]. *Lab Chip*, 2013, 13: 1093-1101.
- [19] Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, et al. Structure and function of the blood-brain barrier [J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37: 13-25.
- [20] Li W, Chen Z, Chin I, et al. The role of VE-cadherin in blood-brain barrier integrity under central nervous system pathological conditions [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2018, 16: 1375-1384.
- [21] Kaiser MA, Sajja RK, Prasad S, et al. New experimental models of the blood-brain barrier for CNS drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2017, 12: 89-103.
- [22] Shi L, Zeng M, Sun Y, et al. M. Quantification of blood-brain barrier solute permeability and brain transport by multiphoton microscopy [J]. *J Biomech Eng*, 2014, 136: 031005.
- [23] Tun T, Kang YS. Imperatorin is transported through blood-brain barrier by carrier-mediated transporters [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2014, 25: 441-451.