

## 3D 血脑屏障类器官氧糖剥夺模型的构建及冠心宁注射液的保护作用探究

杜宏英<sup>1,2</sup>, 薛志峰<sup>1,2</sup>, 夏忠庭<sup>1,3</sup>, 贺爽<sup>1,2</sup>, 杨剑<sup>1,2</sup>, 朱彦<sup>1,2\*</sup>

(1. 天津中医药大学, 组分中药国家重点实验室, 天津 301617; 2. 天津国际生物医药联合研究院, 中药新药研发中心, 天津 300457; 3. 盈科瑞(天津)创新医药研究有限公司, 天津 300385)

**摘要:** 血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 在维持中枢神经系统稳态方面发挥着重要作用。在许多神经系统疾病如缺血性脑卒中、阿尔茨海默症等疾病中都会出现 BBB 损伤。中医药对于防治缺血性脑卒中潜力巨大, 但临床相关模型的缺乏已成为其应用开发的瓶颈。本研究采用了由人脑微血管内皮细胞 (HBMEC)、人脑星形胶质细胞 (HA) 和人脑血管周细胞 (HBVP) 组成的 BBB 类器官模型, 并建立了细胞活力、屏障通透性及 BBB 标志物表达的氧糖剥夺/复氧 (OGD/R) 条件。然后在该类器官模型中研究了中药冠心宁注射液 (GXNI) 对 OGD/R 诱导的 BBB 功能障碍的保护作用。结果表明, OGD/R 降低 BBB 类器官细胞活力, 增加屏障通透性 (渗漏), 降低紧密连接蛋白闭塞带-1 (ZO-1)、claudin-5、闭塞素和 P-糖蛋白 (P-gp) 的水平。GXNI 可显著阻止 OGD/R 诱导的 BBB 破坏, 如细胞活力降低和通透性增加。本研究为中枢神经系统靶向药物的研发提供了一种新的人类细胞源性 3D 缺血性脑病模型, 并证明了中药 GXNI 在体外可有效保护 BBB 功能障碍。

**关键词:** 血脑屏障; 类器官; 氧糖剥夺/富氧; 缺血性脑卒中; 冠心宁注射液

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)10-3086-09

## Construction of 3D blood-brain barrier organoid oxygen-glucose deprivation model and exploration of the protective effect of Guanxinling injection

DU Hong-ying<sup>1,2</sup>, XUE Zhi-feng<sup>1,2</sup>, XIA Zhong-ting<sup>1,3</sup>, HE Shuang<sup>1,2</sup>, YANG Jian<sup>1,2</sup>, ZHU Yan<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2. Chinese Medicine New Drug Research and Development Center, Tianjin International Biomedical Research Institute, Tianjin 300457, China; 3. Increasepharm (Tianjin) Institute Co., Ltd., Tianjin 300385, China)

**Abstract:** The blood-brain barrier (BBB) plays an important role in maintaining the homeostasis of the central nervous system. BBB is disrupted in many neurological disorders such as ischemic stroke and Alzheimer's disease. Traditional Chinese medicine has great potential to prevent ischemic stroke, but the lack of clinically relevant models has been a challenge. We adapted a BBB organoid model formed by human brain microvascular endothelial cells (HBMEC), human astrocytes (HA), and human brain vascular pericytes (HBVP), and established conditions for oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) on the cell vitality, barrier permeability, as well as BBB signature marker expression. The protective effect of Guanxinling injection (GXNI) on OGD/R-induced BBB dysfunction was then investigated in the organoid model. The results showed that OGD/R decreased BBB organoid cell viability, increased permeability (leakage), decreased the level of tight junction proteins zonula occludens-1 (ZO-1), claudin-5, occludin and P-glycoprotein (P-gp). GXNI significantly prevented OGD/R-induced BBB

收稿日期: 2021-12-31; 修回日期: 2022-02-28.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1704502); 国家科技重大专项 (2018ZX01031301); 国家自然科学基金资助项目 (81873037).

\*通讯作者: Tel: 15822700439, Fax: 86-22-27429103, E-mail: yanzhu.harvard@icloud.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1871

disruption such as the decreased cell viability and increased permeability. This study provides a new human cell-derived 3D ischemic brain disease model for central nervous system-targeted drug research and development and demonstrates that a Chinese injection medicine GXNI effectively protects BBB dysfunction *in vitro*.

**Key words:** blood-brain barrier; organoid; oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; ischemic stroke; Guanxinning injection

血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 由内皮细胞、周细胞、星形胶质细胞以及由内皮细胞之间形成的紧密连接和相应的细胞外基质构成, 对中枢神经系统的物质调节及稳态维持发挥着关键作用<sup>[1]</sup>。在中枢神经系统疾病如缺血性脑卒中、阿尔茨海默症等疾病中, BBB 都会发生明显的病理改变<sup>[2]</sup>。BBB 损伤是缺血性脑卒中的病理特征之一, 会导致水肿和出血性转化<sup>[3]</sup>, 引起继发性脑损伤, 并导致认知功能障碍<sup>[4]</sup>。人们逐渐意识到保护 BBB 对治疗缺血性脑卒中的重要性, 然而体内研究 BBB 损伤较为困难, BBB 体外损伤模型的构建及应用成为挖掘脑部疾病的治疗靶点及发现新型治疗药物的重要技术手段。

研究表明, 中药及其活性成分对脑缺血再灌注损伤具有保护或治疗作用<sup>[5]</sup>。活血化瘀作为治疗心脑血管疾病的重要方法, 其代表性中药如丹参、川芎及其活性成分具有多种药理活性。丹参中主要活性成分如丹酚酸 A<sup>[6]</sup>、丹酚酸 B<sup>[7]</sup>、丹参酮 IIA<sup>[8]</sup> 均表现出对缺血性脑卒中导致的 BBB 损伤具有一定的保护作用; 川芎及其活性成分如川芎嗪、藁本内酯等也显示对 BBB 损伤的保护作用<sup>[9-11]</sup>。冠心宁注射液 (Guanxinning injection, GXNI) 是由丹参和川芎提取物组成的中药注射液, 基于本课题组前期研究表明, GXNI 能降低体内 BBB 透过性, 改善脑缺血再灌注导致的脑损伤<sup>[12]</sup>。为了明确 GXNI 是否能改善缺血性脑卒中进程中的 BBB 损伤, 本研究基于氧糖剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 诱导 3D BBB 类器官的损伤模型, 研究了 GXNI 对 BBB 的保护作用。

中医药防治缺血性脑卒中潜力巨大, 但临床相关模型缺乏已成为其应用开发的瓶颈。本研究基于 3D BBB 类器官模型优化并明确了 OGD/R 诱导的 BBB 损伤模型的条件, 并对其细胞活力、透过性、紧密连接蛋白、P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 等进行检测, 探究了 GXNI 对 OGD/R 诱导的 BBB 类器官损伤的保护作用, 以期在体外利用 BBB 类器官建立相关疾病模型提供实验依据, 并为保护缺血性脑卒中进程中的 BBB 损伤提供新的治疗方法。

## 材料与方法

**细胞** 人脑微血管内皮细胞系 (human brain micro-

vascular endothelial cells, HBMEC)、人星形胶质细胞系 (human astrocytes, HA)、人原代脑血管周细胞 (human brain vascular pericytes, HBVP) 均购自 ScienCell 公司。

**试剂** DMEM 基础培养基、胎牛血清、含 EDTA 的胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 无糖 DMEM 培养基 (上海中乔新舟生物科技有限公司); 周细胞生长补充剂、周细胞培养基 (ScienCell 公司); 内皮生长培养基 (EGM-2-MV, Lonza Bioscience 公司); 青-链霉素溶液 (HyClone 公司); CCK8 溶液 (MCE 公司); Hoechst 33342 (Merck 公司); 钙黄绿素 (calcein AM)/碘化丙啶 (PI)、ZO-1 (zonula occludens-1) 鼠单抗 (33-9100) (Invitrogen 公司); 琼脂糖、FITC Dextran 70 kDa、Rhodamine 123 (Sigma 公司); claudin-5 兔多抗 (ab15106)、occludin 兔单抗 (ab216327)、P-gp 兔多抗 (ab129450)、CD31 兔多抗 (ab32457)、CD13 兔单抗 (ab108310)、GFAP (glial fibrillary acidic protein) 小鼠单抗 (ab10062)、Alexa Fluor 488 (驴抗小鼠二抗)、Alexa Fluor 555 (山羊抗兔二抗)、Alexa Fluor 647 (山羊抗兔二抗) (Abcam 公司); GXNI (国药准字 Z13020779, 神威药业集团有限公司); 依达拉奉 (EDA, 国药准字 H20080056, 国药集团瑞药有限公司)。

**细胞培养** HBVP 培养于含 2% 胎牛血清、周细胞生长补充剂和 1% 青-链霉素的周细胞培养基中。HA 和 HBMEC 培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 DMEM 完全培养基中。所有细胞于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 当细胞生长至 80% 以上时, 消化传代, 进行后续实验。

**类器官形成实验** 类器官形成参考 Cho 等<sup>[13]</sup> 建立的类器官形成方法。将 500 mg 琼脂糖加入 50 mL 去离子水中, 微波加热至融化, 高温高压灭菌, 制得无菌 10 mg·mL<sup>-1</sup> 琼脂糖。将融化的琼脂糖溶液加入 96 孔板中, 每孔 50 μL, 室温固化 15 min 后, 每孔加入 100 μL 的内皮生长培养基。将 HBMEC、HA 和 HBVP 这 3 种细胞消化后重悬计数, 按照 1 500:1 500:1 500 的比例接种至琼脂糖凝胶包被的 96 孔板中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养 48 h, 使其自组装为 3D BBB 类器官。

**2D HBMEC 细胞活力实验** 为了确定 GXNI 给药浓度, 将 HBMEC 以 5×10<sup>3</sup> 个/孔接种于 96 孔板。细胞贴壁后加入不同浓度的 GXNI (1、3、10、30、60、

90  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 作用 24 h 后, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK8 溶液, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h, 采用酶标仪测定在 450 nm 波长处的各孔吸光度 ( $A$ ) 值, 并计算 HBMEC 存活率。

**2D HBMEC 细胞 OGD/R 造模及给药** HBMEC OGD/R 造模前分别预给药 GXNI (1、3、10  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 12 h 后, 将 DMEM 培养基更换为无糖 DMEM 培养基, 并置于缺氧小室 (含 95%  $\text{N}_2$  和 5%  $\text{CO}_2$ ) 中 6 h。缺氧完成后, 将无糖 DMEM 培养基更换为 DMEM 培养基, 并予 GXNI (1、3、10  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  常氧环境中孵育 12 h。

**3D BBB 类器官 OGD/R 造模** 为了模拟脑缺血再灌注损伤, 将 BBB 类器官内皮生长培养基更换为无糖 DMEM 培养基, 并置于缺氧小室 (含 95%  $\text{N}_2$  和 5%  $\text{CO}_2$ ) 中 2、4 或 6 h。缺氧完成后, 将无糖培养基更换为内皮生长培养基, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  常氧环境中孵育 12 h 以实现复氧。

**3D BBB 类器官给药** 3D BBB 类器官形成后, 预给药 GXNI (10  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 12 h 后, OGD 6 h 造模, 并于复氧条件下继续给予 GXNI (10  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 12 h。

**荧光染色实验** 3D BBB 类器官 OGD/R 造模及给药后, 于内皮生长培养基中将不同荧光染料稀释至如下浓度: Hoechst 33342 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、calcein AM 0.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、PI 1.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 备用。弃去细胞培养板中的内皮生长培养基, 将细胞用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 次, 每孔加入荧光染料 50  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min 后 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。于 Operetta 二代高内涵筛选系统 (Perkin Elmer 公司) 成像, 并用 Harmony 4.9 软件对 Operetta 成像进行细胞活力及荧光强度分析。

**BBB 类器官透过性检测及形态学分析** 将准备好的类器官与 FITC Dextran 70 kDa (1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中避光孵育 12 h 后, 与 Hoechst 33342 室温孵育 30 min, 随后 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。于 Operetta 二代高内涵筛选系统成像, 并用 Harmony 4.9 软件对成像进行 3D 重构、荧光强度及形态学参数分析。

**免疫荧光实验** 将已处理好的 BBB 类器官在 96 孔板中用 PBS 洗 2 次, 每次 5 min; 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 每孔 100  $\mu\text{L}$ ; PBS 洗 2 次, 每次 5 min; PBST (含 0.1% Tween-20 的 PBS) 室温放置 1 h; PBS 洗 2 次, 每次 5 min; 2% 牛血清白蛋白 (BSA) 室温封闭 1 h, 每孔 100  $\mu\text{L}$ ; PBS 洗 2 次, 每次 5 min; 适当稀释比例一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 每孔 50  $\mu\text{L}$ ; PBST 洗 2 次, 每次 5 min; 适当稀释比例二抗加 Hoechst 33342 室温孵育 2 h; PBST 洗 2 次, 每次 15 min。于 Operetta 二代高内涵筛选系统成像, 并用 Harmony 4.9 软件对 Operetta 成像进

行荧光强度分析。

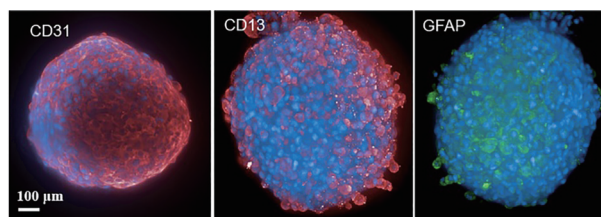
**P-gp 功能检测实验** 将已处理好的 BBB 类器官与 Rhodamine 123 (0.05  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 3 h, PBS 洗 3 次。于 Operetta 二代高内涵筛选系统成像, 并用 Harmony 4.9 软件对 Operetta 成像进行分析。

**数据统计分析** 实验数据均以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 21.0 数据统计软件。两组间比较用独立样本  $t$  检验, 多组间比较用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 并采用 Bonferroni *post hoc* 校正方法, 其中  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。所有数据由 GraphPad Prism 8.0 软件作图。

## 结果

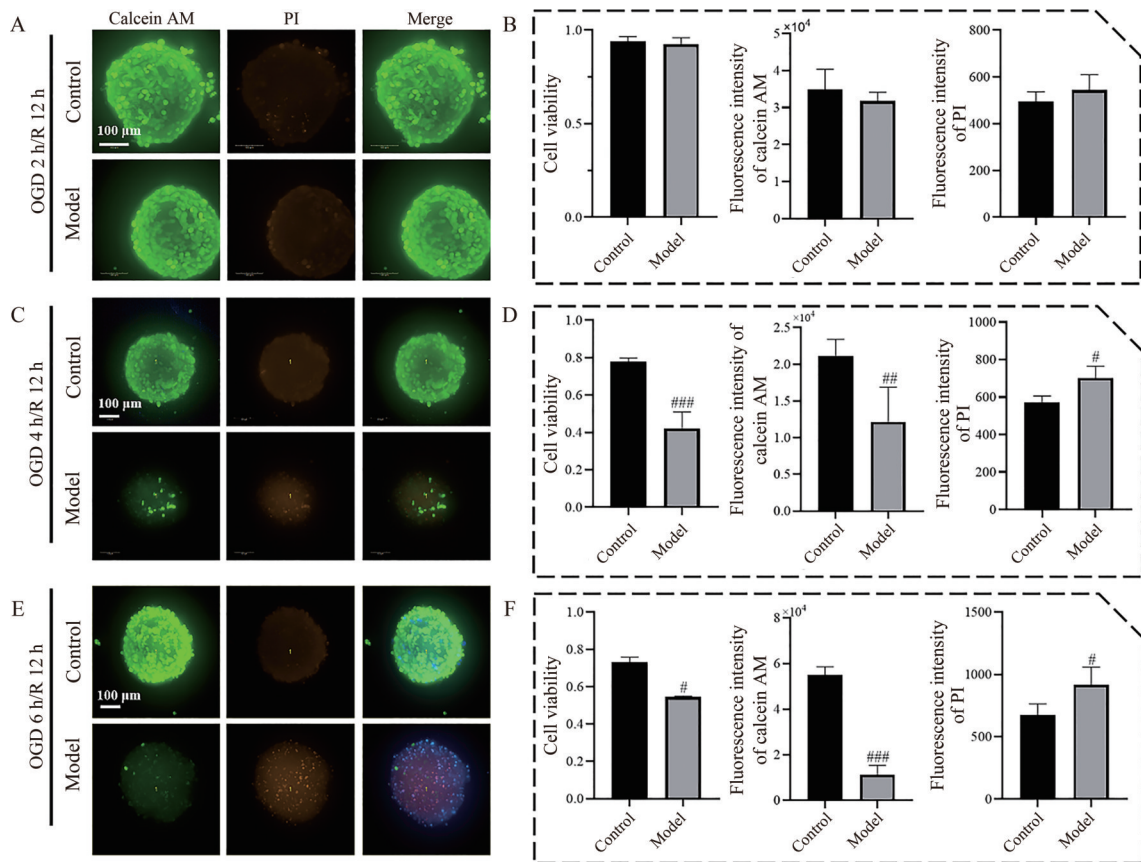
### 1 BBB 类器官细胞类型鉴定及不同造模条件下的细胞活力检测

参考文献方法, 以 CD31 作为 HBMEC 的标志物<sup>[14]</sup>, CD13 作为 HBVP 的标志物<sup>[15]</sup>, GFAP 作为 HA 的标志物<sup>[16]</sup>, 对构成 BBB 类器官的 3 种细胞进行标记, 结果如图 1 所示。



**Figure 1** Cell type identification in blood-brain barrier (BBB) organoids formed by human brain microvascular endothelial cells (HBMEC), human astrocytes (HA), and human brain vascular pericytes (HBVP) by immunofluorescence staining. Nuclei were stained blue by Hoechst 33342; HBMEC and HBVP were stained red by CD31 and CD13 antibodies, respectively; HA were stained green by glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$

BBB 类器官分别在 OGD 2 h/R 12 h、OGD 4 h/R 12 h、OGD 6 h/R 12 h 条件下造模后, 共染 Hoechst 33342、calcein AM、PI 这 3 种染料, 基于二代高内涵三维检测成像细胞表型技术, 评价不同造模条件下 BBB 类器官的细胞活力、活细胞 calcein AM 荧光强度、死细胞或凋亡晚期细胞 PI 荧光强度。结果表明 (图 2), 与对照组相比, OGD 2 h/R 12 h 造模对细胞活力、活细胞 calcein AM 荧光强度、死细胞或凋亡晚期细胞 PI 荧光强度均无影响 (图 2A、B); 但是, OGD 4 h/R 12 h 及 OGD 6 h/R 12 h 造模后, 与对照组相比, 模型组细胞活力降低, calcein AM 荧光强度降低, PI 荧光强度升高 (图 2C~F), 表明 OGD 4 h/R 12 h 及 OGD 6 h/R 12 h 均能导致 BBB 类器官细胞活力降低。



**Figure 2** Cell viability of BBB organoid after different exposure to oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R). A, C, E: Images of live and dead cells following different exposure to OGD/R (A: OGD 2 h/R 12 h; C: OGD 4 h/R 12 h; E: OGD 6 h/R 12 h); B, D, F: Corresponding quantitative analysis of cell viability, calcein AM fluorescence intensity, and propidium iodide (PI) fluorescence intensity (B: OGD 2 h/R 12 h; D: OGD 4 h/R 12 h; F: OGD 6 h/R 12 h).  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ , <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$

## 2 BBB类器官不同造模条件下的透过性检测

OGD 4 h/R 12 h和OGD 6 h/R 12 h造模后BBB类器官的细胞活力有明显降低,为了探究该条件下细胞活力的降低是否会导致BBB类器官功能的改变,进一步研究了不同造模条件对BBB类器官透过性的影响(图3)。FITC Dextran 70 kDa染料分子可通过细胞旁途径穿过BBB,常用来检测BBB功能<sup>[17]</sup>。基于二代高内涵三维检测成像及分析技术,通过分析透过BBB进入类器官内部的FITC-Dextran的荧光强度研究了其透过性(图3A~C)。结果表明,与对照组相比,OGD 4 h/R 12 h造模后,类器官内部的FITC-Dextran的荧光强度无明显改变(图3A);而OGD 6 h/R 12 h造模后,类器官内部的FITC-Dextran荧光强度明显升高(图3B)。对类器官内部的FITC-Dextran的荧光强度进行定量分析后发现,OGD 6 h/R 12 h造模后其差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图3D)。

## 3 BBB类器官造模后的形态学检测

基于上述细胞活力及透过性的检测,本研究选择OGD 6 h/R 12 h造模条件,评价了造模前后类器官的

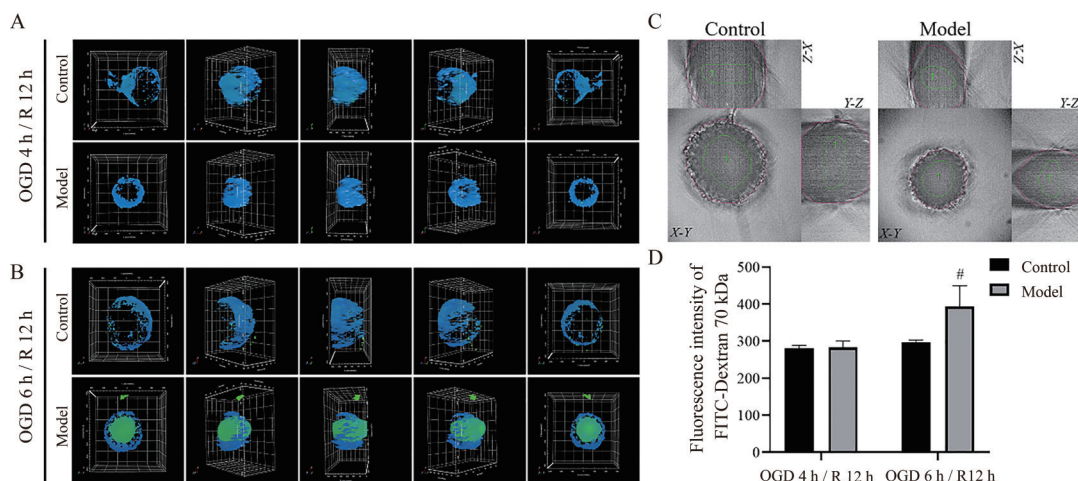
形态学差异。首先观察了造模前对照组与模型组类器官的直径,结果表明,造模前两组间直径无明显差异(图4A)。造模后,利用二代高内涵三维检测成像及分析技术选取类器官(图4B),并定量分析类器官的体积、表面积、球度、高度、最大直径。球度降低表明造模后类器官不再保持完整的球形(图4C)。与对照组相比,模型组类器官体积、表面积、高度、最大横截面积均减小(图4D~G)。

## 4 BBB类器官造模后的紧密连接蛋白检测

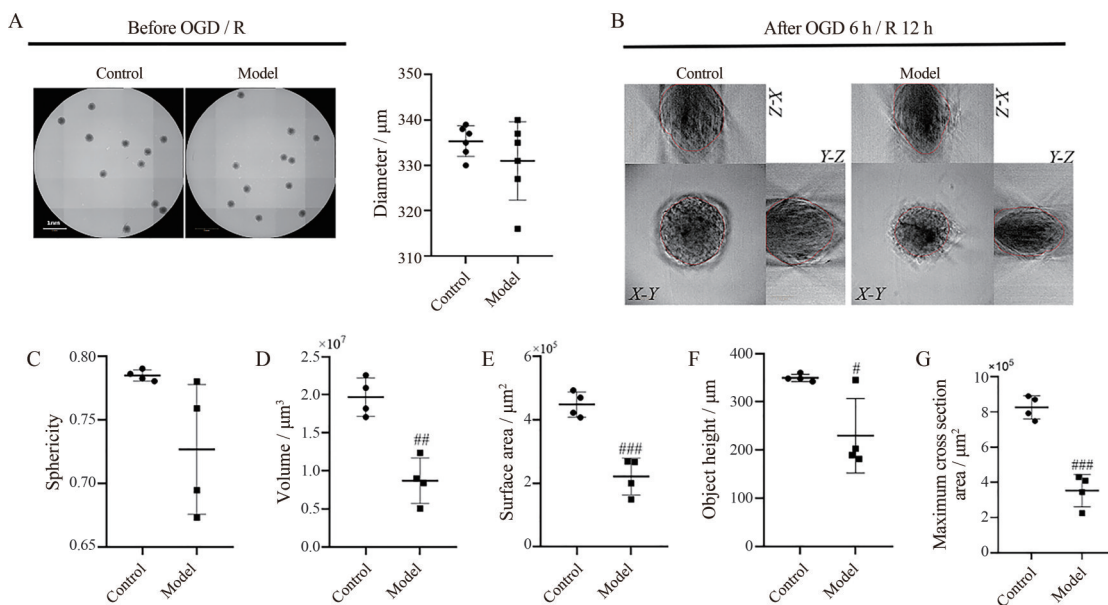
为进一步评价BBB的完整性,对紧密连接蛋白ZO-1、claudin-5、occludin进行免疫荧光染色,利用二代高内涵三维检测成像及分析技术对其进行分析。结果显示,与对照组相比,模型组ZO-1、claudin-5、occludin表达均有所降低(图5A、B),荧光强度定量分析结果显示差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,图5C~E)。

## 5 BBB类器官造模后的P-gp及其功能检测

BBB表达不同的ATP结合盒式蛋白,其中研究最为广泛的是P-gp,脑缺血再灌注损伤过程中,P-gp的表达水平改变可能会影响药物进入BBB<sup>[18]</sup>。Rhodamine



**Figure 3** Paracellular permeability of BBB organoid following OGD/R. A, B: Paracellular permeability of BBB organoids following OGD 4 h/R 12 h (A) and OGD 6 h/R 12 h (B), blue for cell nuclei, green for FITC-Dextran; C: Orthogonal view of the organoid and the core region to be quantified (green lines). X, Y or Z represents the X, Y or Z axis, respectively; D: Quantitative analysis of the total mean fluorescence intensity of the chosen region.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs control. Scale bar: 100  $\mu$ m



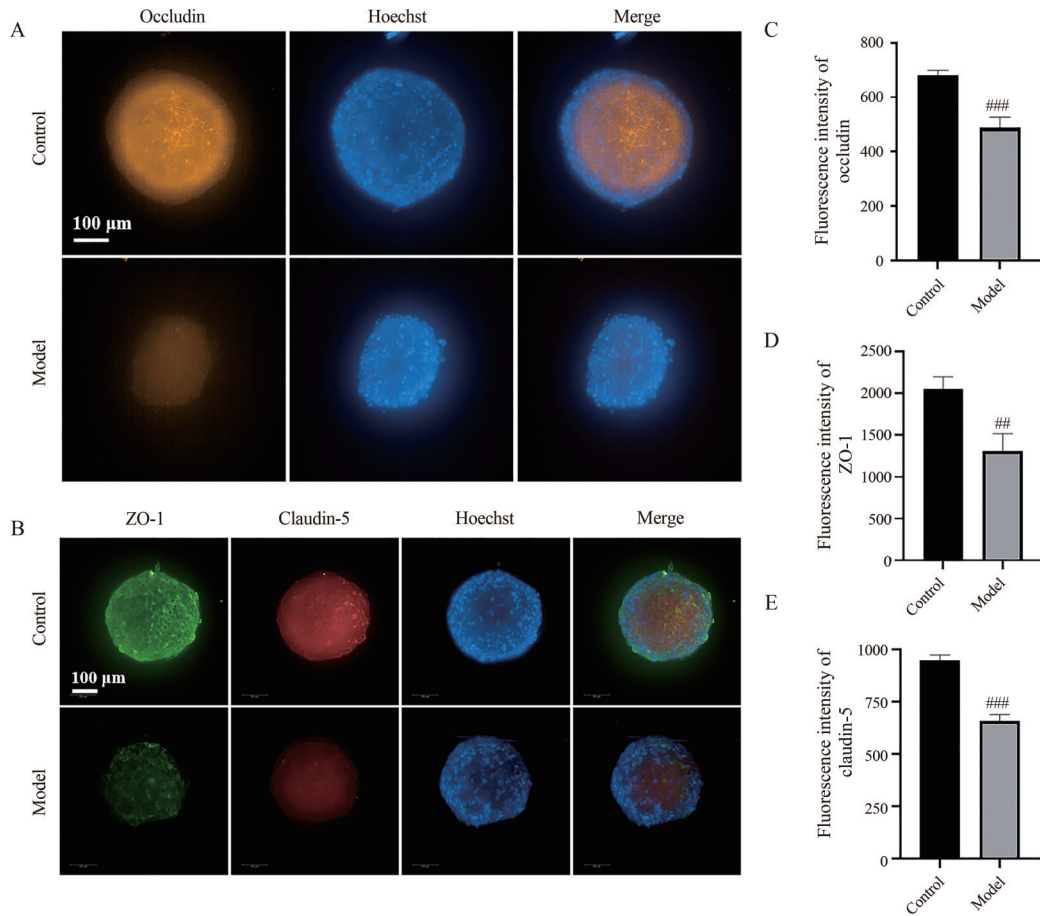
**Figure 4** Morphological analysis of BBB organoids before and after OGD 6 h/R 12 h. A: Morphology of the organoids before OGD 6 h/R 12 h and the quantitative analysis of the diameters of the organoids; B: Orthogonal view of the organoids and the regions to be quantified for morphological analysis following OGD 6 h/R 12 h (red lines); C-G: Quantitative analysis of morphological parameters analysis (C: Sphericity; D: Volume; E: Surface area; F: Object height; G: Maximum cross section area) following OGD 6 h/R 12 h.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ . <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ , <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control. Scale bar: 1 nm

123 是常见的 P-gp 的荧光转运底物, 常用于验证 P-gp 功能<sup>[13]</sup>。因此, 进一步通过免疫荧光实验评价了 OGD 6 h/R 12 h 造模后 P-gp 的表达, 并以 Rhodamine 123 为底物验证了 P-gp 的功能 (图 6)。结果显示, 与对照组相比, 造模后 P-gp 表达明显降低 (图 6A)。通过对类器官内 Rhodamine 123 荧光强度进行分析, 结果显示, OGD 6 h/R 12 h 造模后, 由于 P-gp 表达降低对 Rhodamine 123 的转运功能减弱, 导致类器官内的 Rhodamine 123 的

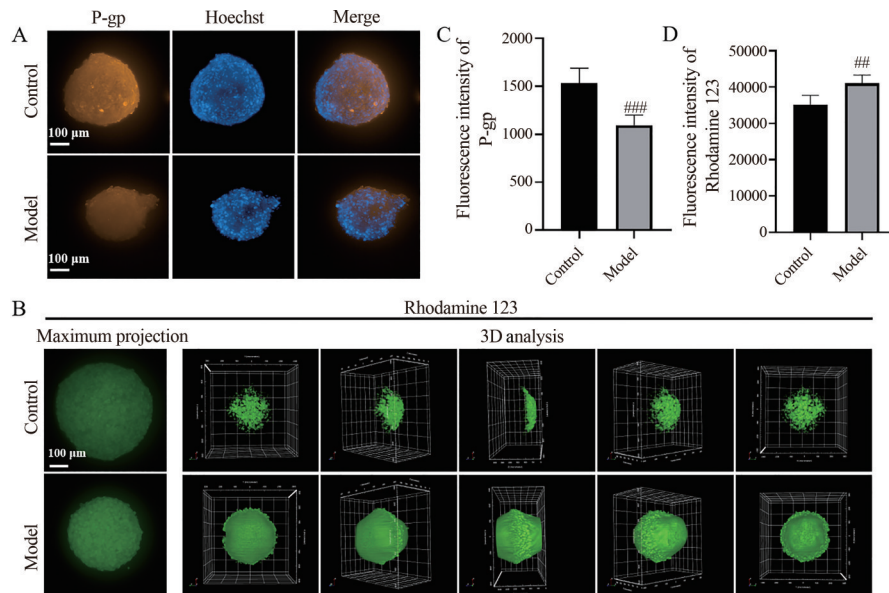
量增多, 荧光强度相应升高 (图 6B), 荧光强度定量分析结果显示差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 6C、D)。

### 6 GXNI 对 OGD 6 h/R 12 h 诱导的 HBMEC 损伤的保护作用

HBMEC 是 BBB 类器官发挥作用的主要细胞, 本研究基于 HBMEC 探索了 GXNI 是否减轻 OGD/R 诱导的细胞损伤。首先利用 CCK8 法检测了 GXNI 对 HBMEC 的细胞活力影响。结果表明, 1、3、10  $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$



**Figure 5** Representative images of immunofluorescence showing expression of occludin (A), zonula occludens-1 (ZO-1) and claudin-5 (B) in BBB organoids following OGD 6 h/R 12 h. C-E: Quantitative analysis of fluorescence intensity (C: Occludin; D: ZO-1; E: Claudin-5).  $\bar{x} \pm s, n = 3$ . ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs control. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$



**Figure 6** Expression and function of P-glycoprotein (P-gp) of BBB organoid following OGD 6 h/R 12 h. A: Representative photomicrographs of immunofluorescence of P-gp (orange) following OGD 6 h/R 12 h; B: Fluorescence images showing influx of Rhodamine 123 following OGD 6 h/R 12 h; C, D: Quantification of fluorescence intensity of P-gp (C) and Rhodamine 123 (D), respectively.  $\bar{x} \pm s, n = 3$ . ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs control. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$

的GXNI均对HBMEC的细胞活力没有影响,而30、60、90  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的GXNI会导致HBMEC细胞活力明显降低(图7A)。因此研究了1、3、10  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 不同浓度GXNI对OGD 6 h/R 12 h诱导的HBMEC损伤的保护作用,选择EDA ( $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ )作为阳性药。结果表明,1、3、10  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的GXNI均可保护OGD 6 h/R 12 h诱导的HBMEC细胞数量降低(图7B、C),未发现明显的药物药效的剂量依赖效应。因此后续选择10  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度用于探究GXNI对BBB的保护作用。

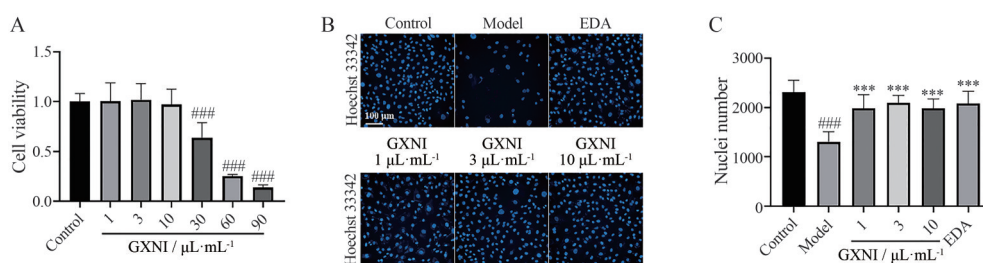
### 7 GXNI对OGD 6 h/R 12 h诱导的BBB类器官损伤的保护作用

基于以上结果,进一步选择GXNI ( $10 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ )研究其对OGD 6 h/R 12 h诱导的BBB类器官损伤的保护

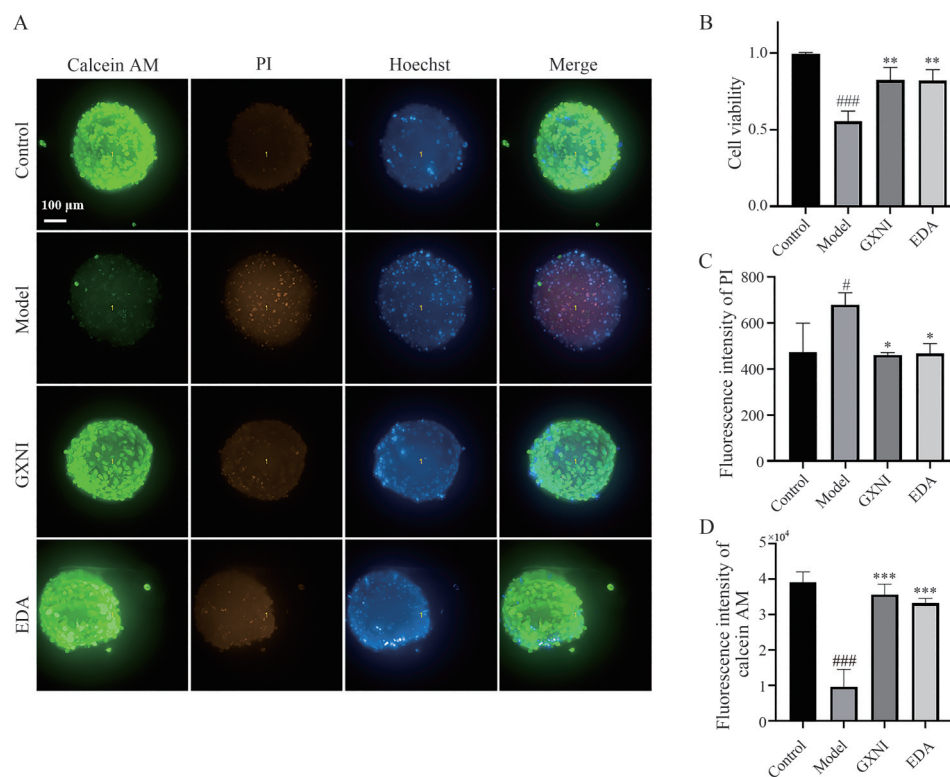
作用,选择EDA ( $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ )作为阳性对照药。结果表明,GXNI可显著改善OGD/R造成的细胞活力降低,表现为绿色荧光减弱(图8A),对细胞活力(图8B)、死细胞PI荧光强度(图8C)、活细胞calcein AM荧光强度(图8D)进行定量分析,差异有统计学意义。阳性药EDA组显示出与GXNI组具有相同的保护作用。接着,本研究探索了GXNI能否从功能上改善OGD 6 h/R 12 h诱导的BBB类器官透过性增大。结果发现,与模型组相比,GXNI能显著降低BBB类器官的透过性(图9)。

### 讨论

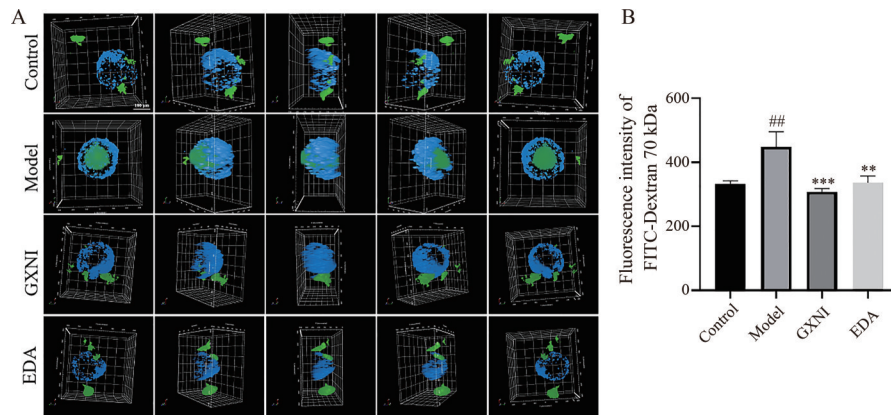
目前常见的体外BBB模型主要有基于Transwell的单层/共培养模型及三维培养模型<sup>[19]</sup>。有研究表明,



**Figure 7** The effect of different concentrations of Guanxinjing injection (GXNI) on cell viability (A) and nuclei number of HBMEC after OGD 6 h/R 12 h (B, C). EDA: Edaravone ( $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . ### $P < 0.001$  vs control; \*\*\* $P < 0.001$  vs model. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$



**Figure 8** The effect of GXNI on the cell viability of BBB organoid following OGD 6 h/R 12 h. A: Representative images of live and dead cells; B-D: Corresponding quantitative analysis of cell viability (B), PI fluorescence intensity (C) and calcein AM fluorescence intensity (D).  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$  vs control; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$



**Figure 9** The effect of GXNI on paracellular permeability of BBB organoid following OGD 6 h/R 12 h. A: Paracellular permeability of BBB organoids; B: Quantitative analysis of the total mean fluorescence intensity of the chosen region.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$

相对于内皮细胞、星形胶质细胞、周细胞共培养的 Transwell 模型, 由这 3 种细胞形成的 BBB 类器官表达更多的 P-gp、ZO-1 等, 能更加真实地模拟体内 BBB 特征<sup>[15]</sup>。这可能与类器官模型中的细胞在 3D 环境中生长, 且 3 种细胞间直接接触有关<sup>[15]</sup>。此外, 相对于 Transwell 模型, 类器官模型易于培养, 操作简便, 与 Operetta 二代高内涵系统结合, 在高通量开发用于治疗中枢神经系统疾病的药物方面具有广泛的应用前景。

缺血性脑卒中进程中 BBB 破坏的主要特征是细胞旁透性增加, 这主要是由于紧密连接蛋白的移位和降解及内皮细胞活力降低。因此本研究首先评估了不同缺氧时间下类器官的细胞活力及透性。结果发现, OGD 2 h/R 12 h 后, 类器官的细胞活力没有明显改变, 这与基于单层内皮细胞作为 BBB 模型的研究结果类似<sup>[20]</sup>; OGD 4 h/R 12 h 及 OGD 6 h/R 12 h 都会使细胞活力显著降低。对类器官 OGD 4 h/R 12 h 及 OGD 6 h/R 12 h 条件下的透性分析结果显示, 只有在 OGD 6 h/R 12 h 条件下观察到进入 BBB 类器官的 FITC-Dextran 显著增加, 表明 BBB 透性增加。对 OGD 6 h/R 12 h 造模后的类器官的形态学的分析结果显示, 模型组类器官的体积、表面积、类器官高度、最大横截面积均明显降低; 此外, 造模后模型组类器官周围可观察到较多细胞碎片 (图片未展示)。这些结果表明造模后类器官变小、且形状改变可能是由于造模后的类器官细胞活力降低, 导致类器官不能维持密度均匀的球体形状, 部分崩解所致。

BBB 的紧密连接是内皮细胞形成的, 通过与星形胶质细胞直接接触维持的大型多蛋白复合物<sup>[21]</sup>, 主要由特定的跨膜蛋白如 claudin、occludin 等与闭锁小带蛋白 (ZO) 相互作用, 并与细胞骨架相连形成<sup>[22]</sup>。紧密连接蛋白复合物的破坏是缺血性脑卒中 BBB 损伤的

标志<sup>[3]</sup>, 这主要是由于紧密连接蛋白的降解或重新分布所致<sup>[23]</sup>。本研究观察到 OGD 6 h/R 12 h 造模条件下 ZO-1、occludin、claudin-5 的表达均明显降低。此外, 还观察到造模后, ZO-1 在细胞膜上的表达变得不连续, 这可能是由于 ZO-1 在细胞中的重新分布所致。

缺血性脑卒中进程中 P-gp 的表达可能有所改变, 本研究通过免疫荧光研究了 P-gp 在 OGD 6 h/R 12 h 造模过程中的表达, 并以 Rhodamine 123 为底物测试 P-gp 功能。结果显示 P-gp 的表达在 OGD 6 h/R 12 h 条件下表现降低趋势, 且 P-gp 功能测试得出了同样结论。这与体外以单层细胞作为 BBB 模型的结果不同, Patak 等<sup>[24]</sup>采用基于 hCMEC/D3 细胞的单层 BBB 模型, 发现缺氧 48 h 后 P-gp 的 mRNA 表达水平和蛋白水平没有明显变化。但也有研究显示, 原代和永生化的大鼠脑内皮细胞在缺氧 6 h/复氧 24 h 后观察到 P-gp 的表达显著增加<sup>[25]</sup>。目前报道的关于 P-gp 在缺氧/复氧模型中的表达仍存在争议, 然而, P-gp 表达下调可能允许在生理条件下不能透过 BBB 的药物进入中枢神经系统发挥治疗作用。

本课题组前期研究结果表明 GXNI 能通过降低 BBB 透性改善缺血再灌注导致的脑损伤<sup>[12]</sup>。本研究基于 BBB 类器官模型探索了 GXNI 对缺氧/复氧造成的 BBB 损伤的保护作用, 提示 GXNI 不仅能显著改善 OGD/R 造成的类器官细胞活力降低, 而且能降低造模引起的类器官透性增加, 表明 GXNI 可能通过保护 BBB 改善缺血性脑卒中。然而, 关于 GXNI 保护 BBB 的相关机制仍不清楚, 有望进一步研究。

本研究表明, BBB 类器官能模拟缺血性脑卒中导致的 BBB 损伤的病理特征, 在体外测试及开发治疗中枢神经系统疾病的新疗法等方面具有巨大应用前景。GXNI 可能通过保护 BBB 改善缺血性脑卒中, 有望为

缺血性脑卒中的治疗提供新的方案。

**作者贡献:** 杜宏英负责实验验证、数据统计和文章撰写; 薛志峰在实验进程及手稿撰写中给予了宝贵意见; 贺爽负责实验试剂的订购并提供了实验指导; 杨剑提供了实验指导; 朱彦、夏忠庭负责总体研究方案设计、论文审阅指导及研究经费支持。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在任何利益冲突。

## References

- [1] Blanchette M, Daneman R. Formation and maintenance of the BBB [J]. *Mech Dev*, 2015, 138 Pt 1: 8-16.
- [2] Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, et al. Blood-brain barrier: from physiology to disease and back [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99: 21-78.
- [3] Abdullahi W, Tripathi D, Ronaldson PT. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315: C343-C356.
- [4] Nzou G, Wicks RT, VanOstrand NR, et al. Multicellular 3D neurovascular unit model for assessing hypoxia and neuroinflammation induced blood-brain barrier dysfunction [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 9766.
- [5] Li Y, Zhong W, Jiang Z, et al. New progress in the approaches for blood-brain barrier protection in acute ischemic stroke [J]. *Brain Res Bull*, 2019, 144: 46-57.
- [6] Liu CD, Liu NN, Zhang S, et al. Salvianolic acid A prevented cerebrovascular endothelial injury caused by acute ischemic stroke through inhibiting the Src signaling pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42: 370-381.
- [7] Li Q, Han LP, Li ZH, et al. Salvianolic acid B alleviate the disruption of blood-brain barrier in rats after cerebral ischemia-reperfusion by inhibiting MAPK pathway [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 1485-1490.
- [8] Subedi L, Gaire BP. Tanshinone IIA: a phytochemical as a promising drug candidate for neurodegenerative diseases [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 169: 105661.
- [9] Wu S, Wang N, Li J, et al. Ligustilide ameliorates the permeability of the blood-brain barrier model *in vitro* during oxygen-glucose deprivation injury through HIF/VEGF pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2019, 73: 316-325.
- [10] Jin Z, Liang J, Kolattukudy PE. Tetramethylpyrazine preserves the integrity of blood-brain barrier associated with upregulation of MCP1 in a murine model of focal ischemic stroke [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 710358.
- [11] Yu B, Yao Y, Zhang X, et al. Synergic neuroprotection between ligusticum chuanxiong hort and borneol against ischemic stroke by neurogenesis *via* modulating reactive astrogliosis and maintaining the blood-brain barrier [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 666790.
- [12] Xiao G, Lyu M, Li Z, et al. Restoration of early deficiency of axonal guidance signaling by guanxinning injection as a novel therapeutic option for acute ischemic stroke [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 165: 105460.
- [13] 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.
- [14] Mbagwu SI, Filgueira L. Differential expression of CD31 and von Willebrand factor on endothelial cells in different regions of the human brain: potential implications for cerebral malaria pathogenesis [J]. *Brain Sci*, 2020, 10: 31.
- [15] Smyth LCD, Rustenhoven J, Scotter EL, et al. Markers for human brain pericytes and smooth muscle cells [J]. *J Chem Neuroanat*, 2018, 92: 48-60.
- [16] Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 32: 121-130.
- [17] Xia ZY, Luo C, Liu BW, et al. Shengui Sansheng Pulvis maintains blood-brain barrier integrity by vasoactive intestinal peptide after ischemic stroke [J]. *Phytomedicine*, 2020, 67: 153158.
- [18] Ding Y, Wang R, Zhang J, et al. Potential regulation mechanisms of P-gp in the blood-brain barrier in hypoxia [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25: 1041-1051.
- [19] Jiang X, Andjelkovic AV, Zhu L, et al. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke [J]. *Prog Neurobiol*, 2018, 163-164: 144-171.
- [20] Ku JM, Taher M, Chin KY, et al. Characterisation of a mouse cerebral microvascular endothelial cell line (bEnd.3) after oxygen glucose deprivation and reoxygenation [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2016, 43: 777-786.
- [21] Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells [J]. *Nature*, 1987, 325: 253-257.
- [22] Ronaldson PT, Davis TP. Targeting transporters: promoting blood-brain barrier repair in response to oxidative stress injury [J]. *Brain Res*, 2015, 1623: 39-52.
- [23] Jiao H, Wang Z, Liu Y, et al. Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult [J]. *J Mol Neurosci*, 2011, 44: 130-139.
- [24] Patak P, Jin F, Schafer ST, et al. The ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC1 are not regulated by hypoxia in immortalised human brain microvascular endothelial cells [J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2011, 3: 12.
- [25] Robertson SJ, Kania KD, Hladky SB, et al. P-glycoprotein expression in immortalised rat brain endothelial cells: comparisons following exogenously applied hydrogen peroxide and after hypoxia-reoxygenation [J]. *J Neurochem*, 2009, 111: 132-141.