

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.05.009

· 基础研究 ·

## CXCR4/SDF-1轴调节人肺腺癌PC-9细胞对Bends细胞体外血脑屏障模型功能的影响

李鸿茹<sup>ab</sup>, 涂洵崴<sup>a,b,▲</sup>, 陈正伟<sup>ab</sup>, 陈愉生<sup>ab</sup>, 韩莉莉<sup>c</sup>(福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院 a. 呼吸与危重症医学科; b. 福建省呼吸病研究所; c. 福建省心血管病重点实验室, 福建 福州 350001)

**[摘要]** **目的:**通过建立体外血脑屏障(blood brain barrier, BBB)模型,探讨人肺腺癌PC-9细胞在CXCR4/SDF-1轴作用下对BBB紧密连接蛋白的影响。**方法:**利用永生化的小鼠脑微血管内皮细胞Bends进行单层培养,建立体外BBB模型;通过跨内皮细胞电阻(transendothelial electrical resistance, TEER)测定及荧光素钠通透性实验判定体外BBB模型的功能状态以及观察PC-9细胞对体外BBB模型功能的影响。Western blotting检测PC-9细胞在CXCR4抑制剂AMD3100、SDF-1单独或联合(1 μg/ml AMD3100, 100 ng/ml SDF-1, AMD3100+SDF-1)作用下对BBB模型功能和内皮细胞紧密连接蛋白表达的影响,Transwell迁移实验检测CXCR4/SDF-1轴对PC-9细胞跨BBB模型细胞层迁移能力的影响。**结果:**Bends细胞单层培养可形成紧密连接的“屏障”并产生较高的TEER,第96 h达到(182.13±5.19)Ω·cm<sup>2</sup>;同时行荧光素钠通透性实验结果显示,BBB具有良好屏障性能,其通透率低于空白对照组( $P<0.05$ )。PC-9细胞作用后,BBB模型TEER逐渐降低,第24 h降至(46.7±4.35)Ω·cm<sup>2</sup>;同时BBB通透率较作用前显著提高( $P<0.05$ )。PC-9细胞在AMD3100作用下能够上调内皮细胞紧密连接蛋白的表达( $P<0.05$ );AMD3100处理组的PC-9细胞穿过BBB的细胞数较空白组明显减少[(43±2) vs (81±2)个,  $P<0.05$ ]。**结论:**AMD3100能够减弱PC-9细胞对Bends细胞建立的体外BBB模型紧密连接的破坏能力。

**[关键词]** 肺腺癌;PC-9细胞;血脑屏障;Bends细胞;紧密连接;跨内皮细胞电阻;迁移;CXCR4/SDF-1轴

**[中图分类号]** R734.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)05-0528-06

## CXCR4/SDF-1 axis regulates the effect of human lung adenocarcinoma PC-9 cells on function of *in vitro* blood-brain barrier model formed by Bends cells

LI Hongru<sup>a,b</sup>, TU Xunwei<sup>a,b,▲</sup>, CHEN Zhengwei<sup>a,b</sup>, CHEN Yusheng<sup>a,b</sup>, HAN Lili<sup>c</sup> (a. Department of Respiratory and Critical Medicine; b. Fujian Institute of Respiratory Diseases; c. Fujian Key Laboratory of Cardiovascular Diseases, Fujian Provincial Hospital, Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the influences of human lung adenocarcinoma PC-9 cells on tight junction proteins of blood brain barrier (BBB) under CXCR4/SDF-1 axis by establishing a model of BBB *in vitro*. **Methods:** The immortalized mouse brain microvascular endothelial Bends cells were used to establish a model of BBB *in vitro* by monolayer culture; Subsequently, transendothelial electric resistance (TEER) and fluorescein sodium permeability experiment were used to detect the function of *in vitro* BBB model and observe the effect of PC-9 cells on the function of BBB model, respectively. Western blotting was used to detect the effect of PC-9 cells on function of BBB model and expressions of endothelial tight junction proteins under the treatment of single or combined AMD3100 and SDF-1 (1 μg/ml AMD3100, 100 ng/ml SDF-1, AMD3100+SDF-1). Transwell assay was used to detect the influence of CXCR4/SDF-1 axis on the ability of PC-9 cells transmigrating the cell layer of BBB model. **Results:** Monolayer culture of Bends cells can form tightly connected BBB with high TEER, which reached (182.13±5.19) Ω·cm<sup>2</sup> at the 96 h; in the meanwhile, fluorescein sodium permeability experiment showed that BBB had significantly lower permeability than that of control group [(40.31±2.43)% vs [150.10±

**[基金项目]** 福建省卫生健康委中青年骨干人才培养项目资助(No. 2019148);福建省立医院高水平医院建设科研联合基金资助项目(No. 2018GSP008);福建医科大学启航基金资助项目(No. 2018QH1130)。Project supported by the Training Program for Young and Middle-Aged Key Talents from the Health Committee of Fujian Province (No. 2019148), the Scientific Research Joint Fund for High-level Hospital Construction of Fujian Provincial Hospital (No. 2018GSP008), and the Sailing Fund of Fujian Medical University (No. 2018QH1130)

**[作者简介]** 李鸿茹(1980-),女,博士,副主任医师,主要从事肺癌靶向治疗相关研究,E-mail:muzi131122@163.com;涂洵崴(1990-)男,硕士,住院医师,主要从事肺癌基础研究,E-mail:1007233941@qq.com。▲为共同第一作者

**[通信作者]** 陈愉生(CHEN Yusheng, corresponding author),主任医师、教授,博士生导师,主要从事肺部感染性疾病及肺癌相关的基础研究,E-mail:cysktz@163.com

3.17]%,  $P<0.05$ ). The TEER of BBB decreased to  $(46.7\pm 4.35) \Omega \cdot \text{cm}^2$  after coculture with PC-9 cells for 24 h, and at the same time the sodium fluorescein permeability of BBB significantly increased than that of pre-treatment ( $[136.32\pm 4.93]\%$  vs  $[50.24\pm 6.21]\%$ ,  $P<0.05$ ). PC-9 cells up-regulated the expressions of tight junction proteins of Bends cells under the treatment of AMD3100 ( $P<0.05$ ). The number of PC-9 cells transmigrating the BBB in AMD3100 treatment group was significantly lower than that of CON group ( $43\pm 2$  vs  $81\pm 2$ ,  $P<0.05$ ). **Conclusion:** AMD3100 can reduce the ability of PC-9 cells destroying the tight junction of the BBB model established *in vitro* by Bends cells.

**[Key words]** lung adenocarcinoma; PC-9 cell; blood brain barrier (BBB); Bends cell; tight junction; transendothelial electric resistance (TEER); migration; CXCR4/SDF-1 axis

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(5): 528-533. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.05.009]

肺癌最常见的远处转移部位之一是脑部,肺癌脑转移的发生率为23%~65%,是脑转移性肿瘤中最常见的类型<sup>[1]</sup>。血脑屏障(blood brain barrier, BBB)是位于脑组织与血液间的一个复杂系统,它能控制血液循环中某些物质向中枢神经组织转运,在维持中枢神经系统内环境的稳定中起着十分重要的作用。相关研究<sup>[2-4]</sup>表明,外伤、缺血缺氧、感染、免疫、肿瘤发生及理化因素的改变等均可引起BBB紧密连接的结构与功能发生改变,造成BBB的损害,进而导致中枢神经系统的相关病变。本研究拟通过建立体外BBB模型,观察人肺腺癌PC-9细胞对BBB体外模型紧密连接的影响,以及CXCR4/SDF-1轴对该影响的调节作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

RPMI 1640培养基购自HyClone公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,0.25% Trypsin-EDTA购自Gibco公司,青链霉素混合溶液购自Gibco公司,牛血来源纤连蛋白(F1141-1MG)购自Sigma公司,荧光素钠购自国药集团化学试剂有限公司,重组人基质细胞衍生因子1a(SDF-1a)购自Peprotech公司,AMD3100购自Selleckchem公司,Western blotting(WB)实验所用一抗(兔抗鼠Claudin-5、Occludin多克隆抗体)购自Invitrogen公司、兔抗鼠Zo-1多克隆抗体购自Novex公司、Alexa Fluor标记的山羊抗兔IgG(H+L)抗体购自Life Technologies公司、HRP标记的山羊抗兔IgG(H+L)抗体购自Abcam公司、Transwell细胞培养池购自Corning公司(PET透明膜,型号:3452、3438),倒置荧光显微镜购自奥林巴斯公司,Millicell ERS-2细胞电阻仪购自Millipore公司。

### 1.2 细胞培养

永生小鼠脑微血管内皮细胞株Bends购自中南大学湘雅医学院细胞中心,PC-9人肺腺癌细胞系由华中科技大学同济医学院同济医院分子医学中心惠赠,GFP-PC-9细胞由上海吉凯基因公司合成。细胞均于含有10%胎牛血清、1%双抗、1%谷氨酰胺的

RPMI 1640培养液中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中常规培养。取对数期生长的细胞进行实验。

### 1.3 免疫荧光染色检测Bends细胞紧密连接蛋白的表达

将2 ml  $1\times 10^5/\text{ml}$ 的Bends细胞悬液滴加到细胞爬片上,当其生长至汇合状态时,4%多聚甲醛固定30 min,0.1% TritonX-100透化10 min,山羊血清封闭10 min,加入1:250稀释的Claudin-5、Occludin、Zo-1兔抗鼠一抗,置4℃冰箱孵育过夜,加入1:200稀释的Alexa Fluor荧光标记山羊抗兔二抗,于37℃温箱避光孵育45 min,DAPI处理后置荧光显微镜下观察,拍照。

### 1.4 体外BBB模型的建立与评价

取生长状态良好的Bends细胞,制成 $5\times 10^4/\text{ml}$ 的细胞悬液,取1.5 ml滴加到Transwell小室上层,在下层加入2.5 ml的1640培养液,放入细胞培养箱培养(Transwell小室预先经10 μg/ml的纤连蛋白处理),以未接种细胞的Transwell小室为对照,隔天换液;光镜下观察Bends细胞生长状况,每隔12 h用Millicell ERS-2细胞电阻仪测定跨内皮细胞电阻值(transendothelial electrical resistance, TEER,其为评价体外血脑屏障功能状态的常用指标)。电阻仪测定实验组的TEER是细胞层与滤过层TEER之和,对照组的电阻值即为滤过层TEER,计作 $TEER_{\text{filter}}$ ,各时间点TEER测量的平均值计作 $TEER_{\text{测量}}$ ,再根据公式 $TEER_{\text{实际}} = (TEER_{\text{测量}} - TEER_{\text{filter}}) \times S_{\text{(底面积)}}$ 计算出Bends细胞层的 $TEER_{\text{实际}}$ ,单位为 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (该小室的底面积为 $4.67 \text{ cm}^2$ )。当TEER达到最大稳定值时,行荧光素钠通透性实验验证BBB是否构建成功。

### 1.5 荧光素钠通透性实验检测体外BBB模型的通透性

将已建立体外BBB的Transwell小室转移到新的6孔板中,以未加入Bends细胞的小室作为空白对照,各组设3个复孔。在小室上层加入含10 mg/L荧光素钠的无酚红1640培养基,下层加入2.5 ml无酚红1640培养基,培养2 h后分别从上、下室取出200 μl溶液放入酶标板中,用酶标仪测定荧光强度;同时测定

5、2.5、1.25、0.625、0.3125 和 0.15625 mg/L 荧光素钠溶液的荧光强度值,绘制标准曲线。小室通透率=下层荧光值/上层荧光值×100%。

#### 1.6 人肺腺癌 PC-9 细胞对体外 BBB 模型功能的影响

当 BBB 模型 TEER 稳定达到最高值时,加入 2 ml  $1 \times 10^5$ /ml 的 PC-9 细胞悬液与 Bends 细胞共培养 24 h,用前述方法检测 PC-9 细胞对体外 BBB 模型 TEER 及荧光素钠通透性的影响。

#### 1.7 WB 检测 PC-9 细胞在 CXCR4/SDF-1 轴影响下对 Bends 细胞紧密连接蛋白表达的影响

根据干预方式不同,将 2 ml  $1 \times 10^5$ /ml 的 PC-9 细胞随机分为 4 组:(1)AMD3100(CXCR4 抑制剂)组,加入终浓度为 1  $\mu$ g/ml 的 AMD3100;(2)SDF-1 组,加入终浓度为 100 ng/ml 的 SDF-1;(3)AMD3100+SDF-1 共处理组,即先加入 1  $\mu$ g/ml 的 AMD3100 处理 6 h,再加入 100 ng/ml 的 SDF-1;(4)CON 组,未经 AMD3100 或 SDF-1 干预处理的 PC-9 细胞悬液。各组细胞分别与 BBB 模型共培养 24 h,提取总蛋白,BCA 法测定各组样品浓度,分别取等量样品行 12%SDS-PAGE,电泳完毕后经湿转法将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温下封闭 2 h,加入一抗即兔抗鼠 Claudin-5、Occludin、Zo-1 和 GAPDH 抗体(稀释比例分别为 1:100、1:100、1:200 和 1:4 000),4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:2 000 稀释),室温孵育 1 h,加入 ECL A、B 液后在 Bio-Rad 凝胶成像系统下曝光并进行图像灰度分析,计算 3 种蛋白相对表达量。

#### 1.8 CXCR4/SDF-1 轴对 PC-9 细胞跨 BBB 层迁移能力的影响

当 Transwell 小室建立好 BBB 时,将小室转移到新的六孔板上,上室内加入 1.5 ml ( $1 \times 10^5$ /ml) 含有 5%FBS 的 GFP-PC-9 细胞悬液,下室加入 2.5 ml 含 10%FBS 的 1640 培养液。实验分 4 组:(1)AMD3100 组,上室加入终浓度为 1  $\mu$ g/ml 的 AMD3100;(2)SDF-1 组,下室加入 SDF-1 至终浓度为 100 ng/ml;(3)AMD3100+SDF-1 共处理组,即如上(1)和(2)组步骤操作,先让 AMD3100 作用 PC-9 细胞 6 h 后,再向下室加入 SDF-1 至终浓度为 100 ng/ml;(4)BBB 对照组,不加药处理。各组细胞培养 24 h 后用棉签将上室上表面细胞擦拭干净,下表面细胞经 4% 多聚甲醛固定后,倒置荧光显微镜( $\times 200$ )下随机选取 5 个视野观察,计数穿过 BBB 层的 GFP-PC-9 细胞。

#### 1.9 统计学处理

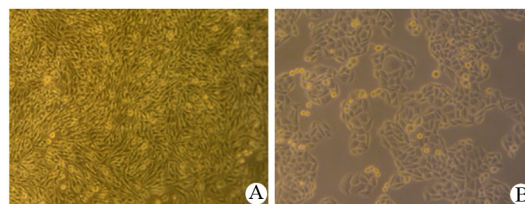
采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,所有实验均独立重复 3 次。正态分布计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)及 LSD-*t* 检验,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有

统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Bends 与 PC-9 细胞的形态特征

Bends 细胞多呈长梭形或类三角形,单层生长,互不重叠,生长至汇合状态时,可见细胞排列紧密,呈典型漩涡状(图 1A)。PC-9 细胞多呈不规则四边形,易成团生长,汇合成片时可呈典型铺路石样(图 1B)。



A: Morphological characteristics of Bends cells ( $\times 10$ );

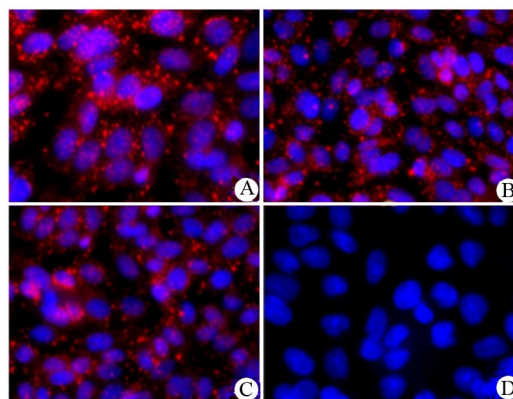
B: Morphological characteristics of PC-9 cells ( $\times 40$ )

图 1 光学显微镜观察 Bends 和 PC-9 细胞的形态

Fig.1 Observation of morphological characteristics of Bends and PC-9 cells under an optical microscope

### 2.2 Claudin-5、Occludin、Zo-1 蛋白在 Bends 细胞中的表达

Claudin-5、Occludin、Zo-1 均为紧密连接蛋白,前两者是穿膜蛋白,Zo-1 是胞质蛋白。免疫荧光实验检测结果(图 2)显示,加入紧密连接蛋白 Claudin-5、Occludin、Zo-1 抗体的 Bends 细胞胞质、胞膜发出红光,而加入 PBS 的空白组只见细胞核发出的蓝光。



A: Claudin-5; B: Occludin; C: Zo-1; D: Control

图 2 Bends 细胞表达紧密连接蛋白 Claudin-5、Occludin 和 Zo-1(荧光显微镜,  $\times 40$ )

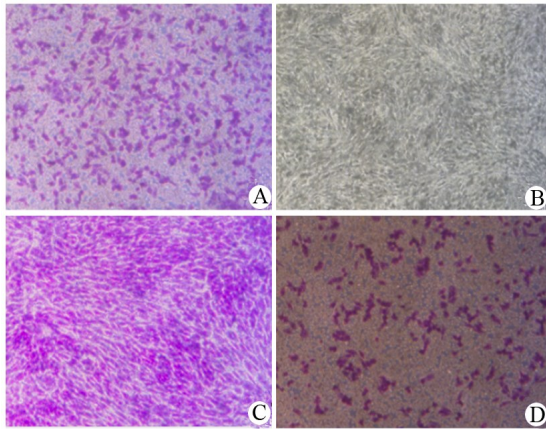
Fig.2 Tight junction proteins Claudin-5, Occludin and Zo-1 expressed in Bends cells (Fluorescent microscopy,  $\times 40$ )

### 2.3 Bends 细胞构建体外 BBB 模型中细胞形态观察

虽然选用的是 PET 透明膜,但并不能动态地观察 Transwell 小室内细胞生长状况,如种板第 12 小时仅能



通过结晶紫染色判定细胞生长状况(图3A);第48小时时Bends细胞生长至汇合,形成典型漩涡状结构,故不需染色即可大致看清细胞生长状态(图3B),后经结晶紫染色证实(图3C);此后Bends细胞又继续保持该状态生长至第96小时,第108小时可见细胞成片漂起脱落,结晶紫染色后可见稀疏分布的Bends细胞(图3D)。



A, B, D: Bends cells stained by crystal violet at the 12<sup>th</sup>, 48<sup>th</sup>, 108<sup>th</sup> hour; C: Bends cells at the 48<sup>th</sup> hour

图3 Transwell小室内Bends细胞生长形态( $\times 10$ )

Fig.3 Morphology of Bends cells grown in the Transwell chamber( $\times 10$ )

#### 2.4 Bends细胞体外BBB模型具有良好的“屏障”性能

TEER测定结果(图4A)显示,随着时间的推移,Bends细胞层的TEER逐渐增大,第96小时时达到最高峰( $182.13 \pm 5.19$ ) $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ,随后TEER下降,这与光镜下观察到的细胞生长情况相一致。96 h后出现的TEER下降,考虑为Bends细胞生长密集后,出现接触抑制,细胞生长状态不佳,细胞开始变圆、脱落漂起,导致TEER下降。

通透率可联合TEER的测定作为判定体外BBB建立功能情况的指标。高电阻、低通透率往往提示着一个稳定的体外BBB模型。根据镜下观察以及TEER测量结果,选用Transwell小室中种植生长第96小时的Bends细胞进行荧光素钠通透性实验,结果(图4B)显示,空白小室表现出良好的通透性,BBB模型荧光素钠通透率显著小于空白对照组[( $40.31 \pm 2.43$ )% vs ( $150.10 \pm 3.17$ )%,  $P < 0.05$ ]。

#### 2.5 PC-9细胞破坏体外BBB屏障功能

显微镜下观察结果(图5)显示,PC-9细胞与Bends细胞共培养24 h后,Bends细胞皱缩、变圆,失去原有的长梭形态,细胞间紧密连接中断、不完整,细胞间原有的漩涡状结构也消失殆尽,仅局部区域偶可见残留的漩涡结构。PC-9细胞杂乱分布其中,

难以辨别细胞性质。

TEER测定结果(图6)显示,接种PC-9细胞后,随着时间延长,BBB模型的TEER值逐渐降低,第24小时时TEER从峰值降低至( $46.70 \pm 4.35$ ) $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 。此时,荧光素钠通透性实验检测结果显示,PC-9细胞共培养组荧光素钠通透率显著高于BBB模型组[( $136.32 \pm 4.93$ )% vs ( $50.24 \pm 6.21$ )%,  $P < 0.05$ ]。

#### 2.6 AMD3100/SDF-1处理的PC-9细胞明显影响Bends细胞中紧密连接蛋白的表达

WB检测结果(图7)显示,AMD3100组与AMD3100+SDF-1组的Claudin-5和Occludin蛋白相对表达量显著高于CON组(均 $P < 0.05$ ),而Claudin-5和Occludin蛋白在SDF-1组与CON组的表达之间无显著差异(均 $P > 0.05$ );Zo-1蛋白在各处理组的表达均显著高于对照组(均 $P < 0.05$ )。

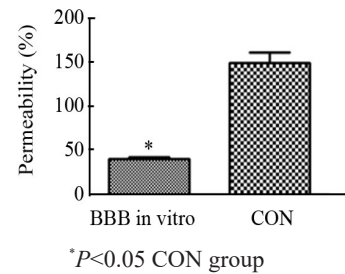
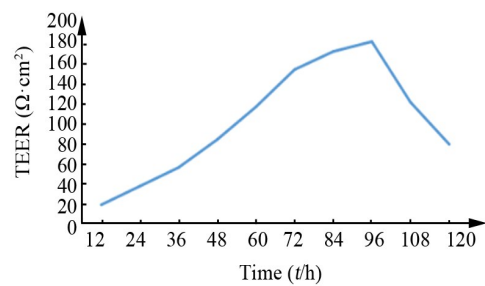


图4 BBB模型的跨内皮细胞电阻(TEER)(A)和荧光素钠通透率(B)

Fig.4 Values of TEER (A) and rates of sodium fluorescein permeability (B) in BBB model

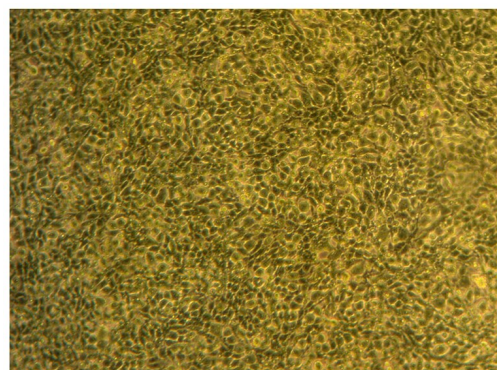


图5 PC-9细胞与Bends细胞共培养24 h后细胞形态( $\times 10$ )

Fig.5 CCell morphology of Bends cells after co-culture with PC-9 cells for 24 h ( $\times 10$ )

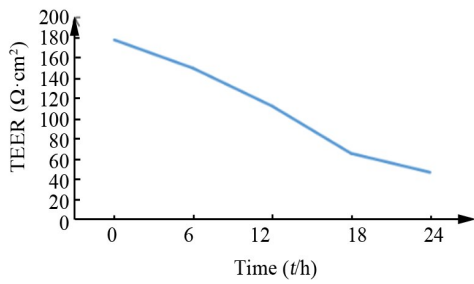
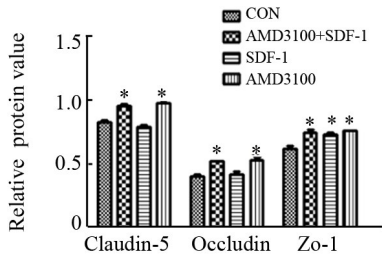
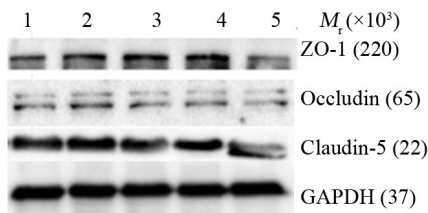


图6 与PC-9细胞共培养降低BBB模型的TEER

Fig.6 Co-culture with PC-9 cells reduced TEER of BBB model



\*P<0.05 vs CON group

1: CON; 2: AMD3100+SDF-1; 3: SDF-1; 4: AMD3100; 5: Bends  
A: Expression of Zo-1, Occludin and Claudin-5 detected by WB;  
B: Statistics for proteins

图7 经AMD3100/SDF-1处理的PC-9细胞对Bends细胞紧密连接蛋白表达的影响

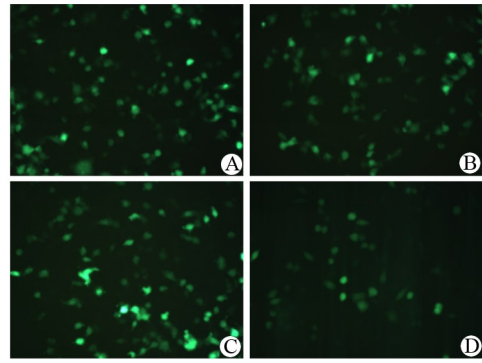
Fig.7 Effects of AMD-9100 / SDF-1-treated PC-9 cells on the expressions of tight junction proteins in Bends cells

### 2.7 AMD300抑制PC-9细胞跨内皮细胞迁移能力

Transwell 迁移实验检测结果(图8)显示, AMD3100组细胞迁移数目明显低于SDF-1组、AMD3100+SDF-1共处理组和BBB组[(43±2) vs (83±3)、(79±1)、(81±2)个,均P<0.05];而SDF-1组、AMD3100+SDF-1共处理组与对照组比较差异无统计学意义(P>0.05)。

### 3 讨论

目前,利用Transwell小室建立体外BBB的方法主要有以下四种:(1)单细胞模型,即仅在小室上层种植脑微血管内皮细胞;(2)接触模型,即在小室膜的正反面分别种植脑微血管内皮细胞与星形胶质细胞;(3)非接触模型,分别在小室上层以及孔板内种植脑微血管内皮细胞与星形胶质细胞;(4)间接模型,即在小室内种植脑微血管内皮细胞,通过与孔板



A: BBB group; B: AMD3100+SDF-1 group; C: SDF-1 group; D: AMD3100 group

图8 AMD3100+SDF-1、SDF-1对PC-9细胞跨BBB模型迁移能力的影响(×200)

Fig.8 Effects of AMD3100 + SDF-1 and SDF-1 alone on the migration ability of PC-9 cells across the BBB model (×200)

内的星形胶质细胞培养一定时间后的培养液相互作用<sup>[5-7]</sup>。本研究采用单细胞模型方法。

TEER可动态监测体外BBB的功能状态,被认为是判定体外血脑屏障模型性能的标准之一,但由于选择建模方式、选用细胞、Transwell小室本身规格的不同,TEER大小各异。文献<sup>[8]</sup>报道,稳定的BBB模型TEER通常在200 Ω·cm<sup>2</sup>以上。本实验单层培养Bends细胞的TEER测量结果显示,第60~108小时时TEER达到并且稳定在100~200 Ω·cm<sup>2</sup>范围,第96小时时TEER达到最大值182.13 Ω·cm<sup>2</sup>。结合光镜观察结果,第48小时Bends细胞已生长至汇合状态,形成典型的漩涡状结构,此后Bends细胞又保持该状态持续了48 h,直至第108小时细胞开始出现成团成片脱落漂起。所以,本实验BBB模型中,TEER在Bends细胞生长汇合后相对稳定了48 h,这与文献<sup>[9-11]</sup>报道(体外BBB内皮细胞生长汇合后,至少需继续培养4~7 d或者更长时间TEER才相对稳定)不符。有研究<sup>[12]</sup>提出,细胞换液时需使用无胎牛血清的培养液,但本研究发现Bends细胞在无胎牛血清的培养液里生长状态不佳;而在文献<sup>[13-14]</sup>中,有加入细胞“生长维持液/加强液”一说。推测Bends细胞不能长时间维持汇合状态,已至形成更高更稳定的电阻值可能与此有关,但国内文献在BBB建模中并未特别强调“加强液”一说。这是本实验建立体外BBB模型的一个疑问。

本课题组前期研究发现上皮来源的PC-9人肺腺癌细胞可表达紧密连接蛋白Claudin-5、Occludin、Zo-1,且不同浓度AMD3100以及SDF-1处理并不影响PC-9细胞紧密连接蛋白的表达。所以,在排除各处理因素对PC-9细胞自身紧密连接蛋白表达影响后,可以确定本研究中紧密连接蛋白表达变化为Bends



细胞在PC-9和CXCR4/SDF-1的作用下发生的改变。当PC-9细胞与Bends细胞共培养后,AMD3100处理组和AMD3100+SDF-1混合处理组Claudin-5、Occludin、Zo-1的表达均显著上调,提示CXCR4抑制剂可保护体外BBB,SDF-1处理后对紧密连接蛋白影响不显著,具体机制尚待深入探讨。结合GFP-PC-9细胞迁移实验结果,AMD3100处理组细胞迁移数目明显减少,也可考虑为AMD3100处理后,上调了Bends细胞层紧密连接蛋白的表达,进而“阻滞”了细胞迁移运动。但也存在以下可能:AMD3100处理后减少了PC-9细胞对Bends细胞间紧密连接结构的破坏程度,相应地减少了细胞迁移数目;又或者AMD3100作为CXCR4特异性拮抗剂本身降低PC-9细胞迁移能力有关。研究<sup>[15-17]</sup>发现,肿瘤细胞可破坏体外血脑屏障紧密连接的完整性,可表现为紧密连接蛋白的重排,进而引起表达量的变化,也可能直接导致其结构状态的改变。本研究发现,PC-9细胞作用Bends单层一定时间,可引起其间固有的漩涡状结构破坏,但由于PC-9细胞自身表达紧密连接蛋白,所以无法用细胞免疫荧光实验进一步说明PC-9细胞在CXCR4/SDF-1作用下引起Bends细胞紧密连接结构破坏情况的问题,尚需其他方法说明。

综上所述,AMD3100作用PC-9细胞后,可能通过相关细胞因子通路作用于内皮细胞,进而上调了Bends细胞紧密连接蛋白的表达。因此,就体外BBB而言,CXCR/SDF-1轴可能参与调节PC-9人肺腺癌细胞对BBB结构完整性的影响。

## 【参考文献】

- [1] PREUSSER M, CAPPER D, ILHAN-MUTLU A, et al. Brain metastases: pathobiology and emerging targeted therapies[J]. *Acta Neuro-pathol*, 2012, 123(2): 205-222. DOI:10.1007/s00401-011-0933-9.
- [2] WOLBURG H, LIPPOLDT A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation[J]. *Vascul Pharmacol*, 2002, 38(6): 323-337. DOI:10.1016/s1537-1891(02)00200-8.
- [3] HAWKINS B T, DAVIS T P. The blood brain barrier/neurovascular unit in health and disease[J]. *Pharmacol Rev*, 2005, 57 (2): 173-185. DOI: 10.1124/pr.57.2.4.
- [4] GLOOR S M, WACHTEL M, BOLLIGER M F, et al. Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier[J]. *Brain Res Rev*, 2001, 36(2/3):258-264. DOI: 10.1016/s0165-0173(01)00102-3.
- [5] PRIETO P, BLAAUBOER B J, DE BOER A G, et al. Blood-brain barrier in vitro models and their application in toxicology. The report and recommendations of ECVAM Workshop 49[J]. *Altern Lab Anim*, 2004, 32(1): 37-50. DOI:10.1177/026119290403200107.
- [6] FRANKE H, GALLA H, BEUCKMANN C T. Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro[J]. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2000, 5(3): 248-256. DOI: 10.1016/s1385-299x(00)00020-9.
- [7] COHEN-KASHI MALINA K, COOPER I, TEICHBERG V I. Closing the gap between the in-vivo and in-vitro blood-brain barrier tightness[J]. *Brain Res*, 2009, 1284: 12-21. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.05.072.
- [8] WILHELM I, FAZAKAS C, KRIZBAI I A. In vitro models of the blood-brain barrier[J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2011, 71(1): 113-128.
- [9] BROWN R C, MORRIS A P, O'NEIL R G. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells[J]. *Brain Res*, 2007, 1130(1): 17-30. DOI:10.1016/j.brainres.2006.10.083.
- [10] CANDELA P, SAINT-POL J, KUNTZ M, et al. In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes[J]. *Brain Res*, 2015, 1594: 15-26. DOI:10.1016/j.brainres.2014.10.047.
- [11] 何芳. 脂多糖致脑微血管内皮细胞通透性升高的机制研究[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [12] 鲍欢. 体外建立血脑屏障细胞模型及其屏障功能的建立[D]. 苏州: 苏州大学, 2003.
- [13] SHAYAN G, CHOI Y S, SHUSTA E V, et al. Murine in vitro model of the blood-brain barrier for evaluating drug transport[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 42(1/2): 148-155. DOI:10.1016/j.ejps.2010.11.005.
- [14] WEIDENFELLER C, SCHROT S, ZOZULYA A, et al. Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone[J]. *Brain Res*, 2005, 1053(1/2): 162-174. DOI:10.1016/j.brainres.2005.06.049.
- [15] 赵晓云, 李波, 曹立业, 等. 小细胞肺癌细胞诱发人脑微血管内皮细胞紧密连接的开放[J]. *解剖科学进展*, 2009, 15(2): 183-187, 191. DOI:10.16695/j.cnki.1006-2947.2009.02.027.
- [16] FAZAKAS C, WILHELM I, NAGYOSZI P, et al. Transmigration of melanoma cells through the ZSED4XZSED4X role of endothelial tight junctions and melanoma-released serine proteases[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20758[2019-06-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3107231/>. DOI:10.1371/journal.pone.0020758.
- [17] FENG S R, CEN J N, HUANG Y H, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e20599[2019-06-18] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3157343/>. DOI:10.1371/journal.pone.0020599.

【收稿日期】 2019-12-01

【修回日期】 2020-04-26

【本文编辑】 黄静怡