

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.36.051

松胞菌素 B 开放血脑屏障的研究进展*

张东智 韩大勇 刘耀华 赵世光[△]

(哈尔滨医科大学附属第一医院神经外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:血脑屏障的是人体自然屏障之一。其主要作用是阻止有害物质通过颅内血管进入脑实质,并同时辅助排出脑内代谢物质等。对相当多的颅内恶性肿瘤术后患者,血脑屏障在一定程度上阻碍了化疗药物进入脑实质,从而影响化疗效果。因此近年来越来越多的学者将研究重点放在如何开放血脑屏障这个问题上。血脑屏障构成主要为毛细血管的内皮细胞、基膜周细胞和星状胶质细胞的足突,其中血管内皮细胞处于最重要的地位。原因归结于它自身的一个特殊结构——紧密连接。紧密连接是否完整,功能是否可以正常发挥关系到内皮细胞的完整性,因此对血脑屏障的开放有着举足轻重的作用。维持紧密连接结构中功能蛋白功能的能量物质为葡萄糖。脑血管中的葡萄糖进入脑实质需载体或通道,脑组织负责此过程的物质为葡萄糖转运蛋白 1(GLUT1)。本文作者通过松胞菌素 B 抑制葡萄糖转运蛋白 1,降低能量供应从而影响紧密连接功能,最终引起血脑屏障开放角度做一综述。

关键词:血脑屏障;松胞菌素 B;紧密连接;化学治疗

中图分类号:R741.02;Q593.24 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)36-7194-03

Research Progress on the Effect of Cytochalasin B Opening Blood-Brain Barrier*

ZHANG Dong-zhi, HAN Da-yong, LIU Yao-hua, ZHAO Shi-guang[△]

(Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT: Blood-Brain Barrier (BBB) is one of the human body barriers. Its main role is to prevent harmful substances from entering the brain by intracranial vessel, and at the same time to discharge the brain metabolites. For patients with intracranial malignant tumor, blood brain barrier to some extent hinders the chemotherapy drugs into brain parenchyma, which affects the effect of chemotherapy. In recent years, more and more scholars focus on how to open the blood brain barrier. Blood brain barrier is composed of capillary endothelial cells, basement membrane of pericytes and astrocyte foot processes, among which endothelial cell is the most important part, because of tight junction. The normal function of tight junction is related to the integrity of the endothelial cells, so it is important to the opening of blood brain barrier. The substance which can maintain protein function in tight junction is glucose. When glucose in the cerebral blood vessel passing through endothelial cells need carrier or channel, glucose transporter 1 will be responsible for the process. In this paper, I will expound how the cytochalasin B inhibit the glucose transporter 1, then reduce the energy and influence the function of tight junction, and finally result in opening of blood brain barrier.

Key words: Blood-Brain Barrier; Cytochalasin B; Tight junction; Chemotherapy

Chinese Library Classification(CLC): R741.02; Q593.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)36-7194-03

前言

血脑屏障的是人体自然屏障之一,其主要作用是阻止有害物质通过颅内血管进入脑实质,同时辅助排出脑内代谢物质等^[1]。血脑屏障主要由毛细血管的内皮细胞、基膜周细胞和星状胶质细胞的足突构成。对相当多的颅内恶性肿瘤术后患者,血脑屏障在一定程度上阻碍了化疗药物进入脑实质。开放血脑屏障已经成为改善恶性脑肿瘤患者术后生存期的一个重要因素。构成血脑屏障的结构中血管内皮细胞处于最重要的地位,血管内皮细胞的功能一旦受到影响将造成血脑屏障开放。研究影响血管内皮细胞功能的相关因素是目前研究如何控制血脑屏障的

研究热点。松胞菌素 B 可以有效抑制葡萄糖转运蛋白的功能^[2],从而影响内皮细胞中紧密连接发挥作用,一旦紧密连接作用失效,内皮细胞间稳定性受到破坏,血脑屏障随之开放,能够协助提高化疗药物在脑组织及肿瘤组织中的分布浓度,提高化疗药物的疗效,从而有效延长恶性脑肿瘤患者生存期。

1 血 - 脑屏障概述

血液和脑组织之间存在着某种物质屏障,可限制物质在大脑组织和血液之间的自由交换,称之为血 - 脑屏障。脂溶性物质如 O₂、CO₂、乙醇、某些麻醉药物等,很容易通过血脑屏障,但对于不同的水溶性物质来说,其通透性并不一定和分子的大小

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81172388)

作者简介:张东智(1985-),男,硕士研究生,电话:(0451)85555254, E-mail:zdz2424@163.com

△ 通讯作者:赵世光,教授,电话:(0451)85555277, E-mail:guangsz@hotmail.com

(收稿日期:2014-03-06 接受日期:2014-03-29)

相关^[3]。例如氨基酸的通透性较高,而甘露醇、蔗糖等通透性则很低,甚至不能通透。用电子显微镜观察,构成血-脑屏障的形态学基础成分为毛细血管的内皮细胞、基膜周细胞和星状胶质细胞的足突^[4]。目前研究证明内皮细胞起到至关重要的作用。另外,毛细血管壁对各种物质特殊的通透性也和这种屏障作用有重要的关系。

脑的某些部分,如下丘脑第三脑室周围和延髓后缘区等处的室周器官,血-脑屏障比较薄弱,毛细血管壁对许多物质的通透性高于脑的其它部分^[5]。因此循环血液中的有些物质可以在这些部位进入脑内,作用于相应部位引起效应。另外,当脑组织发生缺氧、损伤等情况以及在脑肿瘤部位,毛细血管壁的通透性增加,一些平时不易透过血-脑屏障的物质此时也可进入受损部位的脑组织。在临床上可以将同位素标记的蛋白注入体内,这些蛋白进入正常脑组织的速度很慢,但较易进入脑肿瘤组织,因此可用这种方法检查肿瘤的部位。临床应用药物治疗神经系统疾病时,必须明确所用的药物是否容易通过血-脑屏障。

2 血脑屏障与化疗

对于颅内恶性肿瘤,如高级别脑胶质瘤,目前仍然依靠手术联合放疗和化疗为主的综合治疗方案。恶性脑肿瘤的复发率仍十分高,一旦复发,半年内死亡率近 100%^[6]。因此,术后完善的化疗方案显得十分重要。但因为血脑屏障的存在,使得只有相对小分子质量、高脂溶性、非离子化的抗癌药物才能通过,虽然新的化疗药物和用药方法不断地出现,可实质性进展并不显著,在恶性脑肿瘤化疗中,最关键的问题还是化疗药物如何通过血脑屏障。目前主要有以下四种给药途径:① 系统选择用药:按照药剂的性质采取相应的途径,采用口服或静脉滴注,其局限性在于,只适合已通过血脑屏障的抗癌药物,不能有效针对所有类型肿瘤术后化疗,此外还易产生毒副作用;② 经颈动脉或椎动脉化疗:按肿瘤的部位选择性动脉插管。通过此方法可以大幅度提高药物浓度,但是同样也具有相当大的毒副作用,尤其对儿童及年轻患者要慎重使用;③ 暂时开放血脑屏障方案:此方法不仅能增加抗癌药物在肿瘤周围的药物浓度,还可延长作用时间;④ 肿瘤内直接给药:如术中肿瘤残腔直接给药、鞘内或脑室内注射、置 Ommaya 贮液囊定期注药,但是此方案存在药物弥散受限等问题。恶性脑肿瘤术后患者需要长期规范性化疗。目前颅内恶性肿瘤术后化疗药物种类主要集中为亚硝胺类如卡氮芥(BCNU)、环己亚硝胺(CCNU);抗代谢药类如 5-氟尿嘧啶(5-FU)、甲氨蝶呤(MTX)、羟基脲(HU)等;生物碱类药物如长春花植物碱、VP-16 等;除此还包括顺铂、卡铂、甲基苄肼、环磷酰胺等有效但难以通过血脑屏障的药物。因此,开放血脑屏障越来越显示出它的重要性。

3 松胞菌素 B 开放血脑屏障的机制

血-脑屏障由血管内皮细胞、基膜周细胞及星形胶质细胞的足突所组成,其中血管内皮细胞对血-脑屏障的功能起到至关重要的作用^[7]。目前研究表明,一旦血管内皮细胞的完整性受到破坏,血-脑屏障将出现很大程度上的功能障碍^[8]。

大脑血管内皮上存在一种特殊的结构称为紧密连接,它起到维持内皮细胞结构完整性的重要作用^[9]。紧密连接基本组成

包括咬合蛋白(occludin)、闭合蛋白(cludins)、连接粘附分子、3 种完整的膜蛋白及闭合小环蛋白(zonula occludens-1、zonula occludens-2 和 zonula occludens-3)等^[10]。Shoichiro 等人认为咬合蛋白及闭合蛋白是脑血管内皮细胞紧密连接功能活性的最重要调节因子,对血脑屏障通透性可能起着至关重要的调节作用^[11]。紧密连接处各蛋白的活动需要葡萄糖提供能量。在人体各器官中,学者们发现了许多种不同的葡萄糖转运蛋白,并将其命名为葡萄糖转运蛋白家族,其中脑组织中以葡萄糖转运蛋白 1(GLUT1)为主^[12]。其工作原理就是将血管中通过的葡萄糖以载体或通道的形式转运进入相应器官组织内实现最终能量供应,脑内也不例外。完成脑内此过程的即葡萄糖转运蛋白 1,它是介导葡萄糖经过血脑屏障的主要转运体。血管中的葡萄糖流经大脑时会识别内皮细胞表面的某种特殊位点并激活它,位点的活跃会引起 GLUT1 结构的变化^[10,13],进而形成通道样结构供葡萄糖通过。在大脑内根据 GLUT1 基因翻译后修饰程度不同可分为 GLUT1 55ku 异构体和 45 ku 异构体,在内皮细胞上以糖基化程度高的 55 ku 异构体为主^[14]。近年来,学者们对抑制葡萄糖转运蛋白后血脑屏障的开放情况产生浓厚的兴趣,因此找到一种可以有效抑制葡萄糖转运蛋白的物质成为迫切的任务。经过大鼠体内实验^[15],松胞菌素 B 逐渐走进学者们的视野。松胞菌素 B 是从真菌类中分离得到的代谢产物,是肌动蛋白的聚合抑制剂。松胞菌素 B 还可抑制葡萄糖的输送,参与细胞膜间的相互作用^[16]。已有研究证明,松胞菌素 B 可以有效的结合葡萄糖转运蛋白 1,并对其抑制。实验证明松胞菌素 B 具有两种结合葡萄糖转运蛋白体状态,其一为跳跃结合,即松胞菌素 B 会间隔结合葡萄糖转运蛋白单体;其二为网状结合,即广泛结合每个葡萄糖转运蛋白单体。文献报道通过分子筛高效液相分析法及超速离心法分析研究比较两种结合状态,发现第一种结合方式比第二种具备更高的亲和力^[17]。松胞菌素 B 通过两种状态与大脑内皮细胞上葡萄糖转运蛋白体结合,影响葡萄糖转运阻断能量供应,从而抑制内皮细胞上紧密连接处闭合蛋白及咬合蛋白发挥功能。这一效应会将明显影响紧密连接功能,从而使内皮细胞完整性受到破坏,引起血脑屏障开放。

4 松胞菌素 B 开放血脑屏障效果评价

检测松胞菌素 B 对血脑屏障的开放效果可以通过体外模型跨内皮电阻(TEER)测定^[18]、血脑屏障通透性检测及血脑屏障电镜观察等进行评价。

测定体外血脑屏障模型跨内皮电阻是检测血脑屏障完整性最经典的方法。在血脑屏障体外模型建立方面,Imola Wilhelm 等做出了十分重要的贡献。Imola Wilhelm 提出共同培养系统理念^[19],将原代人大脑内皮细胞经过缓和的胰蛋白酶作用后培养在胶原涂层的 12 孔滤板上,待内皮细胞与滤板周围的周细胞及胶质细胞融合,该体外血脑屏障模型成功地模拟脑内血脑屏障功能^[19]。检测该模型跨内皮电阻大约达到 1100 Ohms/cm²,经过 10 μ M 松胞菌素 B 作用的血脑屏障的跨内皮电阻最大下降到 500 Ohms/cm²,提示松胞菌素 B 能够开放血脑屏障。

通过测定脑组织内荧光素钠含量对血脑屏障通透性检测同样证明了松胞菌素 B 能够开放血脑屏障,当向人体正常脑组

组织中注射荧光素钠后,测定脑组织中荧光素钠含量仅达到 260 $\mu\text{g/g}$,而当应用松胞菌素 B 后检测荧光素钠含量可达 1000 $\mu\text{g/g}$,通透性提高近 3 倍。

应用电子显微镜观察血脑屏障的形态构造,同样证实了应用松胞菌素 B 后血脑屏障遭到破坏。利用 Imola Wilhelm 建立的体外血脑屏障模型^[20],观察到松胞菌素 B 具有同样效果,能够显著提高滤板以下液体中化疗药物的浓度。

5 小结与展望

当代神经外科医师除了解除颅内恶性肿瘤带给患者的症状外,往往更加关注术后的化学治疗,这对患者的肿瘤复发及患者的生存期有着巨大影响。松胞菌素 B 针对血脑屏障开放的研究还不够完善,以往对血脑屏障开放的讨论主要集中在对其开放时是否会造成血脑屏障结构的破坏、开放的血脑屏障是否具有时效性、是永久开放还是暂时开放、开放是否可控等方面。目前研究松胞菌素 B 对血脑屏障的开放是与其应用浓度有关,随时间延长可被代谢。血脑屏障可被暂时开放,破坏性小,但浓度与开放时间尚需要进一步检测。我们认为在研究血脑屏障开放方面,应注意几点:首先,开放血脑屏障本身是一把双刃剑,血脑屏障是人体的一道防卫线,暂时的开放只是希望更有效的化疗药物通过,如果开放血脑屏障的方法是以破坏为基础,长远的看对患者的影响将是弊大于利;其次,开放血脑屏障的物质最好是可控性的,可以进一步研究利用某种可调控组件与松胞菌素 B 连接,通过调控组件控制松胞菌素 B 的释放,尽可能做到血脑屏障的开放及恢复的可控性。

参考文献(References)

- [1] William A. Banks. Brain Meets Body: The Blood-Brain Barrier as an Endocrine Interface[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(9): 4111-4119
- [2] Dick AP, Harik SI, Klip A. Identification and characterization of the glucose transporter of the blood-brain barrier by cytochalasin B binding and immunological reactivity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984, 81(22): 7233-7237
- [3] Andrew D. Wong, MaoYe, Amanda F. Levy, et al. The blood-brain barrier: an engineering perspective[J]. *Front Neuroeng*, 2013, 6: 7
- [4] Soo Young Kim, Marion Buckwalter, Hermona Soreq, et al. Blood-brain barrier dysfunction-induced inflammatory signaling in brain pathology and epileptogenesis[J]. *Epilepsia*, 2012, 53(06): 37-44
- [5] Nhan T, Burqess A, Cho EE, et al. Drug delivery to the brain by focused ultrasound induced blood-brain barrier disruption: Quantitative evaluation of enhanced permeability of cerebral vasculature using two-photon microscopy[J]. *J Control Release*, 2013, 172(1): 274-280
- [6] Chamberlain MC. Neuro-oncology: a selected review of ASCO 2011 abstracts[J]. *Expert Rev Neurother*, 2011, 11(10): 1371-1377
- [7] Nina M van Sorge, KellyS Doran. Defense at the border: the blood-brain barrier versus bacterial foreigners [J]. *Future Microbiol*, 2012, 7 (3): 383-394
- [8] Dan Yuan, Jerrold R. Turner. Stimulus-induced reorganization of tight junction structure: the role of membrane traffic [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778(3): 709-716
- [9] Katherine R. Spindler, Tien-Huei Hsu. Viral disruption of the blood-brain barrier[J]. *Trends Microbiol*, 2012, 20(6): 282-290
- [10] Carla M. K. Morrow, Dolores Mruk, C. Yan Cheng et al. Claudin and occludin expression and function in the seminiferous epithelium[J]. *Phil Trans R. Soc. B*, 2010, 365: 1679-1696
- [11] Susan J. Vannucci, Fran Maher Ian A. Simpson. Glucose Transporter Proteins in Brain: Delivery of Glucose to Neurons and Glia[J]. *GLIA*, 1997, 2: 221
- [12] Robert T. Watson, Jeffrey E. Pessin. Intracellular Organization of Insulin Signaling and GLUT4 Translocation [J]. *Recent Progress in Hormone Research*, 2001, 56: 175-194
- [13] Yongjun Yu, Tobi G. Maguire, James C. Alwine. Human Cytomegalovirus Activates Glucose Transporter 4 Expression To Increase Glucose Uptake during Infection[J]. *J Virol*, 2011, 85(4): 1573-1580
- [14] P M Abdul Muneer, Saleena Alikunju, Adam M Szlachetka, et al. Impairment of brain endothelial glucose transporter by methamphetamine causes blood-brain barrier dysfunction [J]. *Molecular Neurodegeneration*, 2012, 6: 23
- [15] Mario Merlini, Eric P. Meyer, Alexandra Ulmann-Schuler. Vascular β -amyloid and early astrocyte alterations impair cerebrovascular function and cerebral metabolism in transgenic arcAb mice [J]. *Acta Neuropathol*, 2011, 122(3): 293-311
- [16] Jiyoung Hwang, Myeongjin Yi, Xin Zhang, et al. Cytochalasin B induces apoptosis through the mitochondrial apoptotic pathway in HeLa human cervical carcinoma cells [J]. *Oncology Reports*, 2013, 17: 1929-1935
- [17] Ingo Gottschalk, Andreas Lundqvist, Cheng-Ming Zeng, et al. Conversion between two cytochalasin B-binding states of the human GLUT1 glucose transporter[J]. *Eur. J. Biochem*, 2000, 267:6875-6882
- [18] Serge C. Thal, Clara Luh, Eva-Verena Schaible. Volatile Anesthetics Influence Blood-Brain Barrier Integrity by Modulation of Tight Junction Protein Expression in Traumatic Brain Injury[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e50752
- [19] Csilla Fazakas, Imola Wilhelm, Peter Nagyoszi, et al. Transmigration of Melanoma Cells through the Blood-Brain Barrier: Role of Endothelial Tight Junctions and Melanoma-Released Serine Proteases [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6: 20758
- [20] Imola Wilhelm, Csilla Fazakas, Istvan A. Krizbai. In vitro models of the blood-brain barrier[J]. *Acta Neurobiol Exp*, 2011, 71: 113-128