

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.05.0608

血-神经屏障的研究进展

陈 莉¹, 张恩晖^{1,2}, 陈宇峰^{3,4}, 蔡国君^{1*}

1. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433
2. 解放军第 406 医院药械科, 大连 116041
3. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433
4. 沈阳军区总医院药学部, 沈阳 110016

[摘要] 血-神经屏障(blood-nerve barrier, BNB)是一种类似血-脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的屏障系统, 选择性地限制血液和周围神经系统之间的物质交换。BNB 在神经病变中会出现通透性等方面的改变, 深入了解 BNB 对于治疗此类疾病具有重要意义。本文从 BNB 的结构和功能、细胞生物学研究进展、BNB 在病理情况下的改变及意义, 以及 BNB 与药物作用之间可能存在的联系等方面作一综述。

[关键词] 血-神经屏障; 神经内膜; 神经束膜; 外周神经; 微血管内皮细胞

[中图分类号] R 331.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)05-0608-05

The blood-nerve barrier: research progress

CHEN Li¹, ZHANG En-hui^{1,2}, CHEN Yu-feng^{3,4}, CAI Guo-jun^{1*}

1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Drug and Instrument, No. 406 Hospital of PLA, Dalian 116041, Liaoning, China
3. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
4. Department of Pharmacy, General Hospital of PLA Shenyang Military Area Command, Shenyang 110016, Liaoning, China

[Abstract] The blood-nerve barrier (BNB) is a barrier system similar to blood-brain barrier (BBB), which can selectively limits the interchange of materials between the blood and the peripheral nervous system. It has been reported that the change of BNB permeability occurs in nerve lesions, and further research on BNB is of great significance for the treatment of those diseases. This paper mainly introduced the structure and function of BNB, progress of BNB cellular biology, changes and significance of BNB under pathological conditions, and the possible association between BNB and drug effects.

[Key words] blood-nerve barrier; endoneurium; perineurium; peripheral nerves; microvascular endothelial cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(5): 608-612]

血-神经屏障(blood-nerve barrier, BNB)是存在于血液与周围神经系统之间的屏障系统, 选择性地限制血液和外周神经系统(peripheral nervous system, PNS)实质之间的物质转运和交换。BNB 的完整是 PNS 发挥正常功能的必要条件。自从 Manery 和 Bale 提出 BNB 这一概念, 并由 Waksman 研究证实以来, 国内外学者对 BNB 的认识不断深入, 但是与它的中枢神经系统(central nervous system, CNS)相似结构血-脑屏障(blood-brain barrier, BBB)相比, 对于 BNB 的功能、细胞生物学等的了解还很少, BNB 在药理学研究上的重要意义

仍有待深入探讨。

1 BNB 的结构和功能

在 PNS, 神经内的结缔组织分为 3 层包绕神经纤维, 从外到内依次为神经外膜、神经束膜和神经内膜。同时, 滋养周围神经的血管分别称为外膜血管、束膜血管和内膜血管。BNB 由神经束膜和神经内膜血管构成。神经束膜是由胶原纤维、扁平细胞和基底膜构成的板层结构, 各层结构间紧密连接组成了一道能阻止物质通过的“扩散屏障”。神经内膜血管的结构与神经外膜血管和神经束膜血管不尽相

[收稿日期] 2015-09-11 **[接受日期]** 2015-12-13

[作者简介] 陈 莉, 硕士生. E-mail: cl287506435@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871272, E-mail: cai_gj@yahoo.com

同,是类似 BBB 的毛细血管。外周神经微血管内皮细胞(peripheral nerve microvascular endothelial cells, PnMECs)在神经内膜内组成微血管,细胞间通过紧密连接部相连,血管外周被周细胞包绕,这些细胞膜下有微丝汇集附着的致密斑,从而加强了神经内膜血管的屏障功能^[1]。PnMECs 是 BNB 的结构基础^[2]。

BNB 是外来物质进出 PNS 的通道,无论是外来神经毒物还是外源性神经生长因子,首先必须通过 BNB 才能进入 PNS 实质。BNB 对物质转运和交换具备特殊的通透性和选择性,可以选择性通过亲水性物质如无机离子、蛋白质、多糖等。因此 BNB 不仅是一个屏障,还是动态接口,在血液和 PNS 实质之间活跃地进行物质交换^[3]。

BNB 的结构与 BBB 存在本质上的不同^[4]。相对于 BBB, BNB 缺少星形细胞结构,屏障性较弱。Poduslo 等^[5]证明,在体内将小分子、大分子与 PNS 实质分开方面, BNB 和 BBB 可能有相同的效果。这表示 BNB 紧密保护着 PNS 实质。因此,与 BBB 受损导致 CNS 功能异常类似, BNB 被破坏可能引起神经内膜动态平衡破坏,使毒性物质透过 BNB 进入 PNS 实质,最终导致外周神经的损伤、功能异常。

神经被切断、受到挤压或别的损伤后,受损部位的有髓鞘和无髓鞘神经纤维都会经历 Wallerian 退变这一过程^[6]。Wallerian 退变过程中,神经束膜通透性会增加 2 倍来对抗 BNB 破坏。尽管脂滴和蛋白质原料均出现在退化神经的神经束膜处,但是此时神经束膜细胞并未破裂,相反它们增殖、肥大、增加细胞器容量。神经束膜通透性增加是 BNB 受损后的代偿反应。BNB 通透性的改变,通常提示细胞外液组成的改变或者是毒性物质作用于神经束膜或神经内膜的结果。因此, BNB 的完整对维持周围神经正常的生理功能具有重要的意义。

2 BNB 的细胞生物学研究

构成神经内膜微血管的内皮细胞,即 PnMECs,一般无膜孔并含有极少量胞饮囊泡,相邻的内皮细胞由复杂、连续的紧密连接部连接。这些内皮特性 BBB 内皮细胞也有,并构成了 BNB 的解剖学基础,隔离神经内膜与血管内物质,抑制非特异性的细胞转移通道和亲水性分子的细胞旁路扩散。此外,构

成 BNB 的内皮细胞表达多种受体和转运蛋白,这些受体和蛋白能移除毒性代谢产物,利于将必需成分转入 PNS 实质和维持 PNS 微环境的稳定。

为了深入了解 BNB 的特性,研究者们对 PnMECs 的细胞特性进行了一系列的研究。在 20 世纪 90 年代,出现 2 篇关于大鼠和牛的神经内膜内皮细胞的原代培养的文献^[7-8]。然而,牛的原代内皮细胞在评价 BNB 组成细胞的分子进化方面存在一些局限性,大多数实验都采用啮齿类和人类来源的内皮细胞。

Sano 等^[9]用含热敏 SV40 大 T 抗原基因的转基因大鼠(tsA58 rat)的坐骨神经为原材料,提取培养了 PnMECs(称为 TR-BNBs)。实验证明 TR-BNBs 有高的跨内皮电阻(transendothelial electrical resistance, TEER),表达紧密接头蛋白如 occludin、claudin-5、claudin-12 等,摄取乙酰化的低密度脂蛋白,表达 von Willebrand 因子。这说明组成 BNB 的 PnMECs 有类似于组成 BBB 的内皮细胞的屏障特性。

Abe 等^[10]用人的坐骨神经为原材料,提取培养了人源性的 PnMECs,之后转染编码热敏 SV40 大 T 抗原和人的端粒末端转移酶的逆转录病毒载体使原代细胞形成细胞系。此细胞系(称作 FH-BNB)呈纺锤形,并表达 von Willebrand 因子和摄取乙酰化的低密度脂蛋白。FH-BNB 边界也表达紧密接头蛋白,包括 occludin、claudin-5、ZO-1 和 ZO-2。TEER 实验、荧光素钠的细胞旁通透性实验和荧光异硫氰酸盐标记的相对分子质量 4 000 的葡聚糖穿过细胞的实验证明 FH-BNB 存在功能性的紧密连接部。但是用包含 SV40 大 T 抗原的质粒转染原代人源性 PnMECs 后,形成的细胞系不表达 von Willebrand 因子^[11]。这可能是因为怀布尔-帕拉德体(内皮细胞特有的一种小体)合成减少,提示此细胞系在研究血小板黏附/聚集和 BNB 伤口愈合方面存在限制。

3 病理情况下 BNB 改变及意义

Lim 等^[12]发现 BNB 功能障碍会导致神经痛的发生,将小鼠的坐骨神经部分结扎制造的神经损伤模型会逐渐出现慢性疼痛行为,实验检测到神经受损部位及其远端 BNB 被破坏;并且神经受损后,巨噬细胞特性改变,局部出现炎症反应,血管内皮生长

因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达发生变化,细胞因子如白介素 1β (interleukin 1β , IL- 1β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)等表达增加,神经内膜微血管的紧密接头蛋白表达减少。这一系列变化可能的过程是:正常情况下,BNB是完整的,是一个半渗透性屏障,定居的巨噬细胞稀少地分布在神经各处,并且呈细长型。神经受损后,定居的巨噬细胞增殖并分泌 VEGF, VEGF 同时作用于神经束膜和神经内膜微血管,开始破坏 BNB。随后,BNB 受损导致血源巨噬细胞侵入神经内膜部位。血源巨噬细胞可能从神经束膜或神经内膜微血管进入,因为此时这两个部位都受到破坏。之后随着神经损伤时间的增加,巨噬细胞局部分泌细胞因子。这些细胞因子直接作用于轴突,引起神经痛及 BNB 功能持续障碍。促痛分子也会从血液进入神经,加重疼痛。由于 BNB 受损后,受损部位通透性改变,可以根据 BNB 的这种改变研究一种治疗手段,使其只作用于受损的神经,而不影响正常部位。

多灶性运动神经病(multifocal motor neuropathy, MMN)又称多灶性脱髓鞘性运动神经病,是一种周围神经病。MMN 具体的发病机制尚不清楚,但有证据表明其发生、发展与免疫反应有关。BNB 保护 PNS 的神经纤维免受全身性炎症反应和免疫反应的损害^[10]。MMN 患者运动神经的病理检查结果提示,MMN 疾病过程中可能发生 BNB 受损。Shimizu 等^[13]使用来自 MMN 患者的血清处理人源性 PnMECs 后,发现细胞内紧密接头蛋白 claudin-5 的表达水平和 TEER 下降,BNB 受损。而 VEGF 会诱导 BNB 受损,使用抗 VEGF 的抗体逆转了 claudin-5 表达和 TEER 下降的现象^[14]。尽管 MMN 患者的血清中 VEGF 的含量没有增加,但是使用血清处理人源性 PnMECs 后,细胞内 VEGF 分泌明显增加。这提示 VEGF 可能通过自身内分泌机制发挥作用。同时 MMN 患者的血清通过上调核因子 kappa-B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路,使细胞内血管细胞粘附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)表达增加。从 MMN 患者血清中纯化得到的免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)能减少细胞内 claudin-5 的表达,增加 VCAM-1 的表达,导致 BNB 受损,提

示血清中的 IgG 可能是导致 BNB 受损的重要成分^[15]。这些结果可能为阐明 MMN 发病机制和 MMN 中 BNB 受损的触发提供一种新的观点。

慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, CIDP)是一类由免疫介导的运动感觉周围神经病,包括经典型和变异型,其中变异型包括多灶性获得性脱髓鞘性感运动神经病(multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy, MADSAM)和纯运动型、纯感觉性、远端获得性脱髓鞘性对称性神经病(distal acquired demyelinating symmetric neuropathy, DADS)等^[16]。许多报道证实了 BNB 的病理性破坏会导致免疫球蛋白、细胞因子、炎症趋化因子进入 PNS 实质,这是 CIDP 疾病发展的关键过程^[4,17-18]。Shimizu 等^[19]发现分别使用来自经典型 CIDP、MADSAM 和 DADS 患者的血清处理人源性 PnMECs 后,细胞内紧密接头蛋白 claudin-5 的表达水平和 TEER 下降,BNB 被破坏,并且经典型 CIDP 患者血清导致的蛋白水平下降和 TEER 的减少比 MADSAM 和 DADS 患者血清的效果更明显,BNB 受损更严重。CIDP 患者临床表现型不同,BNB 受损程度不同。BNB 破坏的程度可能成为预测 CIDP 临床亚型的有效诊断标志。

神经束膜细胞由紧密接头蛋白,如 occludin、claudin-1、claudin-3 和细胞内支架蛋白 ZO-1,连接构成神经束膜。此屏障限制细胞旁药物转运^[20-21]。Sauer 等^[22]给大鼠注射弗氏完全佐剂建立炎性疼痛模型,之后将基于 claudin-1 进行修饰得到的肽 C1C2 应用到神经束膜,发现能抑制 claudin-1,减少 claudin-1 转运,打开 BNB 的神经束膜,促进药物转运和外源性外周阿片样镇痛。这些效应能被糖原合酶激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK-3)抑制剂完全逆转,可能是通过同源框转录因子 cdx2 发挥作用。选择性、可逆性地调整神经束膜的紧密接头蛋白可能也能控制小分子和大分子的进入,从而治疗神经痛或其他相关疾病。

4 BNB 与药物作用

目前,关于 BNB 与药物治疗作用的相关研究还比较少。临床上发现许多常用药物都有神经毒性,如大肠癌的一线化疗药物奥沙利铂,治疗结核病的

首选药物异烟肼,以及治疗卵巢癌和乳腺癌的一线药物紫杉醇等,其发生率高,严重影响患者的身体健康和生活方式,限制了它们的应用。目前,药物产生神经毒性的确切机制尚不清楚^[23-25]。既然 BNB 对于外周神经系统具有重要的保护作用,那么药物神经毒性产生的原因是否是药物作用于 BNB,引起 BNB 损伤,进而 BNB 通透性改变,最终导致外周神经损伤呢?本课题组也在这方面进行了一些研究,初步发现 BNB 损伤可能参与药物神经毒性的产生(结果待发表),还有待于进一步的研究证明。

另一方面,为了达到保护周围神经的目的,可以通过药物治疗的手段改善 BNB 功能,用于周围神经疾病的治疗或者防治药物神经毒性的发生。出于治疗目的,改善 BNB 功能的可能方法有:(1)用 siRNA、寡聚核苷酸和病毒载体等修饰内皮功能,如在损伤早期使用抗 VEGF 的抗体,减弱 BNB 损伤^[13]以减缓或防治药物神经毒性的发生;(2)用可以通过内皮层到达周细胞膜并增强周细胞活性的小分子亲水性物质修饰 BNB 周细胞。

5 结 语

相对于 BBB 来说,我们对于 BNB 的病理生理学的了解还不足。在机体生长发育阶段和一些神经疾病过程中,BNB 很可能发生一些结构上和功能上的变化。然而来源于不同物种的血管内皮细胞,相同物种不同组织的内皮细胞,相同组织的大血管内皮细胞和微血管内皮细胞,它们之间存在表现型和功能的不同^[26-29]。内皮细胞分化依赖于组织微环境和功能。所以组成 BNB 的神经内膜微血管内皮细胞与构成 BBB 的微血管内皮细胞虽然都是屏障细胞,存在相似的方面,如表达紧密接头蛋白、von Willebrand 因子等,但二者之间也存在不同,如 BNB 内皮细胞不表达有机阴离子转运体 3(organic anion transporter 3, OAT3)和有机阴离子转运多肽(organic anion transporting polypeptides, OATPs)亚型 OATP2,针对 BNB 的研究还需进一步深入。

总之,距离全面、透彻地了解 BNB 的特性、其在病理生理过程中的改变及意义、针对 BNB 进行治疗的方法和药理学意义还有很长的路要走,需要更深入的研究,以及更完善、细致的实验。

[参 考 文 献]

- [1] 周跃,刘正津,梅芳瑞. 血-神经屏障的超微结构特点及临床意义[J]. 中国临床解剖学杂志,1991,17:79-80,84.
- [2] Sano Y, Kanda T. Isolation and properties of endothelial cells forming the blood-nerve barrier[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 686: 417-425.
- [3] Mizisin A P, Weerasuriya A. Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult[J]. *Acta Neuropathol*, 2011, 121: 291-312.
- [4] Kanda T. Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2013, 84: 208-212.
- [5] Poduslo J F, Curran G L, Berg C T. Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 5705-5709.
- [6] Stoll G, Jander S, Myers R R. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system; from Augustus Waller's observations to neuroinflammation [J]. *J Peripher Nerv Syst*, 2002, 7: 13-27.
- [7] Argall K G, Armati P J, Pollard J D. A method for the isolation and culture of rat peripheral nerve vascular endothelial cells[J]. *Mol Cell Neurosci*, 1994, 5: 413-417.
- [8] Kanda T, Iwasaki T, Yamawaki M, Ikeda K. Isolation and culture of bovine endothelial cells of endoneurial origin[J]. *J Neurosci Res*, 1997, 49: 769-777.
- [9] Sano Y, Shimizu F, Nakayama H, Abe M, Maeda T, Ohtsuki S, et al. Endothelial cells constituting blood-nerve barrier have highly specialized characteristics as barrier-forming cells[J]. *Cell Struct Funct*, 2007, 32: 139-147.
- [10] Abe M, Sano Y, Maeda T, Shimizu F, Kashiwamura Y, Haruki H, et al. Establishment and characterization of human peripheral nerve microvascular endothelial cell lines; a new *in vitro* blood-nerve barrier (BNB) model [J]. *Cell Struct Funct*, 2012, 37: 89-100.
- [11] Yosef N, Ubogu E E. An immortalized human blood-nerve barrier endothelial cell line for *in vitro*

- permeability studies[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2013, 33: 175-186.
- [12] Lim T K, Shi X Q, Martin H C, Huang H, Luheshi G, Rivest S, et al. Blood-nerve barrier dysfunction contributes to the generation of neuropathic pain and allows targeting of injured nerves for pain relief[J]. *Pain*, 2014, 155: 954-967.
- [13] Shimizu F, Omoto M, Sano Y, Mastui N, Miyashiro A, Tasaki A, et al. Sera from patients with multifocal motor neuropathy disrupt the blood-nerve barrier[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2014, 85: 526-537.
- [14] Shimizu F, Sano Y, Abe M A, Maeda T, Ohtsuki S, Terasaki T, et al. Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226: 255-266.
- [15] Kusunoki S. How is the blood-nerve barrier involved in the pathogenetic mechanisms of multifocal motor neuropathy[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2014, 85: 473.
- [16] French CIDP Study Group. Recommendations on diagnostic strategies for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2008, 79: 115-118.
- [17] Kanda T, Numata Y, Mizusawa H. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy; decreased claudin-5 and relocated ZO-1[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2004, 75: 765-769.
- [18] Ubogu E E. The molecular and biophysical characterization of the human blood-nerve barrier; current concepts[J]. *J Vasc Res*, 2013, 50: 289-303.
- [19] Shimizu F, Sawai S, Sano Y, Beppu M, Misawa S, Nishihara H, et al. Severity and patterns of blood-nerve barrier breakdown in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy; correlations with clinical subtypes [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e104205.
- [20] Pummi K P, Aho H J, Laato M K, Peltonen J T, Peltonen S A. Tight junction proteins and perineurial cells in neurofibromas [J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54: 53-61.
- [21] Rittner H L, Amasheh S, Moshourab R, Hackel D, Yamdeu R S, Mousa S A, et al. Modulation of tight junction proteins in the perineurium to facilitate peripheral opioid analgesia[J]. *Anesthesiology*, 2012, 116: 1323-1334.
- [22] Sauer R S, Krug S M, Hackel D, Staat C, Konasin N, Yang S, et al. Safety, efficacy, and molecular mechanism of claudin-1-specific peptides to enhance blood-nerve-barrier permeability [J]. *J Control Release*, 2014, 185: 88-98.
- [23] Zedan A H, Hansen T F, Fex Svenningsen A, Vilholm O J. Oxaliplatin-induced neuropathy in colorectal cancer; many questions with few answers[J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2014, 13: 73-80.
- [24] Kass J S, Shandera W X. Nervous system effects of antituberculosis therapy[J]. *CNS Drugs*, 2010, 24: 655-667.
- [25] Gornstein E, Schwarz T L. The paradox of paclitaxel neurotoxicity; mechanisms and unanswered questions [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 76: 175-183.
- [26] Aird W C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium; I. structure, function, and mechanisms [J]. *Circ Res*, 2007, 100: 158-173.
- [27] Aird W C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium; II. representative vascular beds[J]. *Circ Res*, 2007, 100: 174-190.
- [28] Man S, Ubogu E E, Williams K A, Tucky B, Callahan M K, Ransohoff R M. Human brain microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells differentially facilitate leukocyte recruitment and utilize chemokines for T cell migration [J]. *Clin Dev Immunol*, 2008, 2008: 384982.
- [29] Reddy C L, Yosef N, Ubogu E E. VEGF-A165 potently induces human blood-nerve barrier endothelial cell proliferation, angiogenesis and wound healing *in vitro*[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2013, 33: 789-801.