

## 应用于药物评价的血脑屏障模型研究进展

黄韩韩, 咎孟晴, 南楠, 牛剑钊, 马玲云, 许鸣镞\*, 刘倩\*  
中国食品药品检定研究院, 北京 100050

**摘要:** 介绍了几种常见的血脑屏障体内外模型及一种脑渗透性分类方案。其中体外模型主要有溶剂水/分配模型、平行人工膜渗透模型、Transwell细胞模型、微流控芯片血脑屏障模型、永生化内皮细胞系建立的血脑屏障模型、三维血脑屏障模型等。体内模型主要有脑/血浆比率测定法、小鼠脑摄取量分析法、啮齿类动物原位脑灌注法、脑微透析法等。随着血脑屏障模型不断成熟完善, 将有助于筛选中枢神经系统药物, 为神经系统疾病的治疗提供更多的理论依据。通过分析和评价各种不同的血脑屏障模型, 以期为血脑屏障模型研究及中枢神经系统药物研发提供新的思路。

**关键词:** 血脑屏障; 体外模型; 体内模型; 脑渗透性分类; 中枢神经系统

**中图分类号:** R965.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2022) 03-0568-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.03.024

## Research progress of blood-brain barrier model applied to drug evaluation

HUANG Hanhan, ZAN Mengqing, NAN Nan, NIU Jianzhao, MA Lingyun, XU Mingdi, LIU Qian  
National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

**Abstract:** This article introduces several common *in vivo* and *in vitro* models of the blood-brain barrier and a classification scheme for brain permeability. Among them, *in vitro* models mainly include solvent water/distribution model, parallel artificial membrane permeation model, Transwell cell model, microfluidic chip blood-brain barrier model, blood-brain barrier model established by immortalized endothelial cell line, 3D blood-brain barrier model, etc. *In vivo* models mainly include brain/plasma ratio determination method, mouse brain uptake analysis method, rodent *in situ* brain perfusion method, brain microdialysis method and so on. As the blood-brain barrier model continues to mature and improve, it will help to screen drugs for the central nervous system and provide more theoretical basis for the treatment of neurological diseases. This article analyzes and evaluates various blood-brain barrier models, hoping to provide new ideas for blood-brain barrier model research and central nervous system drug research and development.

**Key words:** blood brain barrier; *in vitro* model; *in vivo* model; brain penetration classification; central nervous system

血脑屏障 (brain-blood barrier, BBB) 是脑毛细血管阻止某些物质 (多半是有害的) 进入脑循环, 从而保持脑组织内环境基本稳定的一种基本结构。从生物学和功能角度来看, BBB 在维持脑内稳态方面起着至关重要的作用, 它允许脑组织所需要的营养物质通过, 有效阻止一些异物和大分子物质通过, 防止血液中的有害物质侵入脑内, 维持脑部内环境稳态平衡和实现正常的中枢神经系统 (central

nervous system, CNS) 功能<sup>[1]</sup>。BBB 是一种选择性渗透屏障, 在保护 CNS 的同时, 也使大多数 CNS 候选药物难以透过 BBB, 这也是临床中 CNS 活性药物较少的原因之一<sup>[2]</sup>。

在药物开发过程中, 一方面要通过可靠方法来筛选能透过 BBB 的药物, 一方面又要考虑到作用于外周的物质不会透过 BBB, 避免产生 CNS 副作用<sup>[3]</sup>。目前主要通过体内和体外研究考察药物的渗

收稿日期: 2021-09-14

基金项目: 国家重点研发计划——重大疾病治疗药物制剂质量研究评价技术联合研究 (2020YFE0201700)

第一作者: 黄韩韩, 女, 硕士研究生, 研究方向为药品检验。E-mail: 2073039385@qq.com

\*共同通信作者: 许鸣镞, 男, 主任药师, 研究方向为药品检验。Tel: (010) 53851657 E-mail: xumingdi@nifdc.org.cn

刘倩, 女, 研究员, 研究方向为药品检验。Tel: (010) 67095626 E-mail: liuqian@nifdc.org.cn

透性,体外研究有着更加可控、操作简单、使用实验动物较少等优点,并且更加符合伦理道德要求<sup>[4]</sup>,而体内研究数据比体外更为接近药物真实脑内渗透情况,各有千秋。本文主要分为体外BBB渗透性评价方法和体内BBB渗透性评价方法,介绍几种常见BBB模型及评价方法,阐述各个模型或方法的基本组成、特点以及其在药学研究中的应用,以期BBB模型研究提供理论基础,此外还介绍了一种脑渗透性分类方案,可以作为一种BBB被动渗透率初筛方法。

## 1 体外BBB渗透性评价方法

体外评价方法具有高通量、成本较低且操作较为简单等特点,其适用范围较广,因此被广泛用于BBB渗透性化合物的初步筛选,在BBB转运机制研究中具有重大作用。常用的体外BBB渗透性评价方法主要有溶剂/水分配模型、平行人工膜渗透模型(parallel artificial membrane permeation assay, PAMPA)以及细胞模型。

### 1.1 溶剂/水分配模型

溶剂/水分配模型是考察药物跨BBB被动渗透的分子选择性。由Seiler等<sup>[5]</sup>于1974年提出,通过测量 $\Delta\log P$ 参数来阐明药物氢键键合能力,并反映2个不同的过程:辛醇代表在外周血中与蛋白质的结合;烷烃代表溶质分配进入大脑的非极性区域。 $\Delta\log P$ 通常定义为在辛醇-水系统中测得的溶质分配系数与在惰性烷烃-水悬浮液中测得的溶质分配系数之差。其原理是药物溶解在水中的分子与溶剂形成氢键。当这种溶剂化分子从水中转移进入磷脂双层时,溶质-水氢键被破坏(去溶剂化),而新的溶质-脂质氢键在脂质相中形成。2种溶剂化状态之间的自由能差直接影响分子通过被动扩散穿过生物屏障的能力。Geldern等<sup>[6]</sup>使用 $\Delta\log P$ 参数优化一系列内皮素A受体拮抗剂的结构。该种模型通过测定 $\Delta\log P$ 参数来考察药物跨BBB被动渗透的分子选择性,在药学研究中较为简单,适用于形成氢键能力少且转运方式为被动扩散的药物。

### 1.2 PAMPA模型

PAMPA模型是一种可用于测定化合物通过(和保留于)浓缩的带负电荷的磷脂双分子屏障的通透性的方法<sup>[7]</sup>,主要是以人工脑磷脂作为生物膜来进行药物BBB渗透研究。Di等<sup>[8]</sup>通过溶解在十二烷中的猪脑脂质提取物提出了PAMPA模型,并证明药物分子可以归类为CNS+/-活性类别。2009年,Dagenais等<sup>[9]</sup>构建了可用于预测BBB渗透性的组合

式PAMPA模型,PAMPA膜由溶解在十二烷中的卵磷脂组成。2011年,Tsinman等<sup>[10]</sup>研发出改良版的PAMPA膜配方,基于猪脑脂质提取物,在比十二烷烃更黏稠的烷烃中加入了5倍浓度的脂类物质,采用更薄的膜,同时在pH=7.4的接收缓冲液中加入1种新的促沉降形成表面活性剂来模拟漏槽条件。Tsinman等<sup>[10]</sup>对采用PAMPA-BBB模型测定的108种化合物的内在渗透速率值与197种已公布的鼠类原位脑灌注表面积渗透率(PS)测量值之间进行相关性分析,发现2种模型相关性很高,选择系数为0.97。

付莹等<sup>[11]</sup>以实验室合成的苯丙酸类化合物为研究对象,在96孔板上铺1层牛脑磷脂的十二烷溶液作为PAMPA模型,并通过高效液相色谱法测定其化合物的BBB渗透率。实验过程中由于合成的苯丙酸类化合物的水溶性较差,需要添加助溶剂加以溶解,因此还考察了4种助溶剂(二甲亚砜、乙腈、乙醇、正丙醇)对化合物溶解度的影响和助溶剂浓度对磷脂膜完整性的影响。最终选择10%的正丙醇作为助溶剂,并测得各个化合物的渗透率,为实验室CNS类药物开发提供了指导,并且对PAMPA模型助溶剂的选择提供了借鉴依据。

PAMPA模型目前已经广泛应用于抗阿尔茨海默症、神经保护等CNS类药物,以及抗胶质瘤、实体瘤脑转移等抗肿瘤类药物的筛选。周杰彬等<sup>[12]</sup>采用PAMPA模型对具有抑制急性淋巴白血病细胞增殖活性的一系列原小檗碱衍生物进行了跨BBB活性评价,发现C-9位取代的小檗碱衍生物可以提高化合物的细胞膜渗透性。张潮等<sup>[13]</sup>采用PAMPA模型发现新型抗肿瘤药物*N*-(*N'*-苄氧羰基甘氨酸脯氨酸)丙卡巴肼(Z-GP-Pcb)具有较高的透过BBB活性。Milica等<sup>[14]</sup>采用PAMPA模型考察了18种具有神经保护作用的多巴胺转运体底物的被动渗透性,并建立了QSPR模型,用于预测具有BBB渗透性率的化合物。吴柏林等<sup>[15]</sup>采用PAMPA模型对新合成的具有神经保护功能的咖啡酯类衍生物跨BBB通透性进行预测,发现咖啡酯类衍生物结构中的酚类羟基和双键对神经保护活性有重要影响,而且改造后的化合物BBB通透性有了显著的改善。Alexandra等<sup>[16]</sup>采用PAMPA模型考察了从姜中提取的姜酚及其衍生物的BBB渗透性,结果表明,从生姜中提取分离到的[6]-姜辣素、[8]-姜辣素及[6]-姜烯酚能以被动扩散方式通过BBB,提示它们可能参与了生姜提取物在CNS中的积极作用。

PAMPA 模型实际操作简便,而且成本低,主要用于转运方式为被动扩散药物的 BBB 渗透性研究,不适合研究主动转运和极性药物,研究这类化合物 PAMPA 模型应与 Caco-2 细胞模型联合使用预测此类化合物的渗透性,从而得到较好的结果<sup>[17]</sup>。

### 1.3 Transwell 细胞模型

Transwell 细胞模型是最简单可行,也是最常见的 BBB 体外细胞模型,可以分为单培养 Transwell 模型和共培养 Transwell 模型。

**1.3.1 单培养 Transwell 模型** 指在 Transwell 膜上接种单一类型的内皮细胞,如大鼠的脑微血管内皮细胞。王利民等<sup>[18]</sup>为了研究高温诱导基质金属蛋白酶-9 对体外 BBB 模型中连接蛋白-1 (claudin-1) 蛋白表达的影响,分别将星形胶质细胞与脑微血管内皮细胞进行培养,结果显示,高温可导致体外 BBB 模型 claudin-1 表达下降, BBB 通透性增加,而外源性添加金属蛋白酶-9 能进一步加剧该损伤,提示高温可通过金属蛋白酶-9 加重 BBB 破坏。该研究为发热加重脑缺血后 BBB 损伤提供了新机制。

这种模型的优点是操作简单、成本较低、并且细胞存活时间较长,但是由于其与脑内实际微环境相差较大,并且忽视腔内血细胞与血液的流动,缺乏剪切应力,所得结果并不能准确反映药物在体内的实际透过情况,具有局限性。

**1.3.2 共培养 Transwell 模型** 虽然从动物体内分离的脑内皮细胞可以作为体外模型的原型,但是随着时间的推移,细胞的活性逐渐降低,而与星形胶质细胞共培养,可以明显提高 BBB 模型的紧密性和完整性,显著增加细胞的跨内皮电阻 (trans-endothelial electric resistance, TEER),降低多种物质通透性<sup>[19-20]</sup>。

单雅楠等<sup>[21]</sup>为了探究十溴联苯醚对 BBB 体外模型渗透性的影响,利用小鼠脑微血管内皮细胞与星形胶质细胞构建非接触共培养 BBB 体外模型。分别进行小鼠脑微血管内皮细胞和星形胶质细胞培养,用鼠尾胶原包被 Transwell 嵌套,培养后得到的星形胶质细胞接种于下室 3 d 后,再将小鼠脑微血管内皮细胞接种于该 Transwell 嵌套中。每天观察细胞融合状态,融合后的内皮-胶质细胞非接触共培养模型即为 BBB 体外模型。再将不同浓度的十溴联苯醚作用于该 BBB 模型,从不同的指标观察其渗透性的变化。结果表明十溴联苯醚可致 BBB 体外模型 TEER 降低, Occludin 蛋白表达减少, BBB 的完整性破坏。

该种模型由于是将星形胶质细胞与脑内皮细胞共培养,更加贴近脑内实际微环境,且具有更高的 TEER 值,形成的结构更加紧密,能够更好地模拟在体 BBB,用于考察药物的 BBB 渗透性。

### 1.4 微流控芯片 BBB 模型

由于动物研究不能够提供大量平行可控的、相似的内环境用于定量研究,且传统的体外 BBB 模型具有流体不可控等缺点,所以自 20 世纪 90 年代微流控技术问世以来研究人员积极将其用于体外 BBB 模型的构建<sup>[22]</sup>,能够判断剪切应力对 BBB 的影响。

Jeong 等<sup>[23]</sup>用 4×4 交叉微通道阵列在芯片上形成 16 个 BBB 位点,并集成多电极阵列来测量所有 16 个不同位点的跨内皮细胞电阻 (TEER),从而实现对屏障功能的无标记实时分析。在施加体内水平切应力的同时,将原代小鼠内皮细胞和原代星形胶质细胞在芯片中进行共培养。该芯片允许通过 TEER 测量、葡聚糖渗透性以及免疫染色来分析屏障功能。结果显示,星形胶质细胞与血管内皮细胞共培养,以及体内水平的剪应力作用,均可使星形胶质细胞与内皮细胞形成更紧密的连接,并显著降低屏障通透性。

该种模型将微流控技术应用于 BBB 模型的构建,模拟腔内血细胞之间流动形成的剪切应力,是对 Transwell 模型中缺乏剪切应力的弥补和完善,具有更高的 TEER 值,降低屏障的通透性,能够特异性表达 BBB 生理结构。而由 Jeong 的实验得出结论,通过创建 1 个 BBB 芯片可以更好地模拟体内 BBB 微环境,开发多位点的 BBB 芯片能够更准确的预测药物的渗透性和毒性,从而为 CNS 类药物的开发提供新思路。

### 1.5 永生化内皮细胞系建立的 BBB 模型

目前许多研究开发了不同来源的永生化内皮细胞系,但却只有少数能够表达 BBB 在体内的功能和特性。其中永生化人脑微血管内皮细胞系,大鼠脑微血管内皮细胞系和小鼠脑微血管内皮细胞系是被用来建模次数最多的 3 种细胞系<sup>[24]</sup>。Shi 等<sup>[25]</sup>利用小鼠脑内皮细胞和星形胶质细胞建立了 1 种优化的体外 BBB 模型,测量 5 种超顺磁性氧化铁纳米颗粒样品的 BBB 渗透性。结果表明,可以通过创建生物活性涂层来操纵超顺磁性氧化铁纳米颗粒的 BBB 渗透性,使得更好地将药物输送到大脑,治疗广泛的神经系统疾病。

通过永生化内皮细胞系建立的 BBB 模型,可以避免原代细胞提取的繁琐步骤,以及培养过程中的

细胞污染。但是用永生化人内皮细胞研究小分子转运机制具有一定局限性,适用于转运蛋白和受体的机制研究;大鼠内皮细胞系由于不能形成致密的连接复合物,导致细胞旁通透性较高,限制其在CNS候选药物中的应用;而小鼠脑微血管内皮细胞系可以形成致密的屏障,具有低细胞旁通透性和可以保留的内皮表型特点,拥有广阔的应用前景。

### 1.6 三维(3D)BBB模型

通过使用一种细胞外基质(extracellular matrix, ECM)与同质的细胞群,如星形胶质细胞、周细胞及微血管所共组建的二维(2D)培养物已经被广泛应用。但是这种2D培养物所建立的BBB模型只能将细胞培养限制在平面环境中。而最近几年出现了3D球体、3D水凝胶以及ECM和固体支架所建立的3D培养模型<sup>[26-27]</sup>。Agathe等<sup>[28]</sup>开发并验证了1个3D BBB毛细血管模型。以人星形胶质细胞和周细胞为细胞支持,纤维蛋白-胶原微纤维水凝胶为ECM,共培养可使人脑微血管内皮细胞自组织成毛细血管网络。凝胶可以滴在标准培养板上,不需要微芯片。因此,凝胶滴的体积是可调的。

与简单2D共培养相比,3D BBB模型提供了接近的细胞毒性结果,并且细胞在纤维蛋白-胶原纤维水凝胶为ECM中培养后,其自化类似于毛细血管生成,在空间结构上更加贴近实际BBB结构,也带来了关于BBB微血管网络毒性的进一步信息。

## 2 体内BBB渗透性评价方法

体内BBB渗透性评价方法主要是通过测量与大脑渗透性有关参数从而评价药物的渗透情况,如表观渗透系数、脑内药物浓度等。该类评价方法最为可靠,但是成本高、通量低、操作较为复杂、且适用范围有限。体内BBB渗透性评价方法主要有脑/血浆比率测定法、小鼠脑摄取量分析法、啮齿类动物原位脑灌注法以及脑微透析法等。

### 2.1 脑/血浆比率测定法

啮齿动物的脑血浆分配比作为脑渗透的指标,被持续、广泛地应用于药物开发中。该方法通过对动物进行给药,取外周血或脑组织进行匀浆,采用液质联用等方法检测其中的药物浓度,根据所得到的药动学参数,从而考察药物的脑/血浆比率,进一步得知药物的BBB渗透性。该方法操作简便,但是易受血液或脑组织中其他物质的干扰,得到的药物BBB渗透性实验数据与真实情况有偏差。

### 2.2 小鼠脑摄取量分析法

该方法是1种短期组织分布测定法。主要是通

过对小鼠进行尾静脉给药,收集血液和脑组织,采用液质联用等方法检测全血或脑组织中的药物浓度,测定脑与血液的浓度比,从而计算表观渗透系数( $P_{app}$ ),考察药物的BBB渗透性。

该方法除考虑了血液/血浆总浓度,还考虑了未结合部分,但该方法仍存在一些局限性,因为它假设忽略了新陈代谢、回流和血液溶质竞争。小鼠脑摄取量分析法无法控制可能影响BBB固有渗透率的因素,这些因素可能会低估或高估 $P_{app}$ 值。

### 2.3 啮齿类动物原位脑灌注法

原位脑灌注技术是研究物质跨BBB转运的1种快速、灵敏、定量和可控的方法。其利用通过脑部的颈动脉灌注液代替体循环血液的灌注液,已知浓度的待测物质混入灌注液中并被灌注进入脑部<sup>[29]</sup>。试验结束后,停止灌注,切除左(或右)脑半球,利用液相二级质谱或放射性分析计算药物脑部初始转运的转移常数、清除率等参数。

该法比离体灌流简单,且更接近药物真实渗透情况。但实验操作复杂、动物用量大、耗时,且对分析检测要求高(放射性标记化合物或液相二级质谱微量分析)。通常情况下,制药工业不会常规性地对啮齿动物的脑灌注研究。

### 2.4 脑微透析法

脑微透析法是在清醒动物大脑内在体的微创取样技术,可进行多位点实时取样,自动化程度较高,是用于检测脑内游离药物浓度的行之有效的方法<sup>[30]</sup>。李豪等<sup>[31]</sup>采用微透析技术收集给药前后脑缺血大鼠的脑脊液,应用液质联用技术动态监测黄芩苷、栀子苷及兴奋性氨基酸的含量变化规律,对黄芩苷、栀子苷配伍抗脑缺血损伤作用进行研究。结果发现栀子苷可以透过BBB,推测黄芩苷和栀子苷配伍可能通过抑制兴奋性氨基酸的释放而发挥脑保护作用。

脑微透析法可以连续采样,实时监测药物在脑内的变化情况,但采样量低、对分析仪器要求较高,且微透析膜对药物的吸附作用导致回收率低,并且要求操作人员具有一定的实验技能,因此仅适用于少数CNS候选药物的BBB渗透性评价。

## 3 脑渗透性分类(brain penetration classification, BPC)

Kalvass等<sup>[32]</sup>介绍了1种BPC方案评估了P-糖蛋白及其他载体介导过程在妨碍或补偿脑渗透性方面的作用。研究人员沿纵轴绘制了P-糖蛋白外排率(efflux rate, ER),将其定义为敲除型和野生型

小鼠之间的 $K_p$ 比值。沿水平轴绘制了血浆中游离药物浓度( $C_{u,pl}$ )与脑组织(匀浆)中游离药物浓度( $C_{u,br}$ )的比值,水平线和垂线的低-高边界分别为 $ER=3$ 和 $C_{u,pl}/C_{u,br}=3$ 。不同象限描述了不同CNS渗透特性:第1类渗透性被P-糖蛋白或其他活性过程削弱;第2类被非P-糖蛋白机制削弱;第3类未被削弱;第4类为P-糖蛋白基底,但由于具有补偿机制而未被削弱。Dagenais等<sup>[10]</sup>在BPC方案中加入了Kalvass未考虑的两个参数:渗透速率与表面积的乘积( $PS_{passive}$ )和大脑平衡半衰期( $t_{1/2,eq}$ )。其中渗透性最高的化合物与BPC第3类化合物(脑渗透性无削弱)有关。第1类和第2类化合物的 $PS_{passive}$ 通常很低,表明BBB渗透性差。

#### 4 结语

目前,国内外应用于药物评价方面的BBB模型主要分为体外和体内两个方面。其中体外评价方法主要有溶剂水/分配模型、PAMPA模型、Transwell细胞模型、微流控芯片BBB模型、永生体内皮细胞系建立的BBB模型以及3D BBB模型,体内的渗透性评价方法主要为脑/血浆比率测定法、小鼠脑摄取量分析法、啮齿类动物原位脑灌注法以及脑微透析法。这些模型主要用于考察CNS类药物的BBB的渗透性或者是探究化合物对BBB渗透性的影响,从而为CNS类药物的研发提供新的思路。

随着科学技术的不断进步以及研究的不断深入,在建立体外BBB渗透性评价方法方面的研究也从PAMPA模型到通过接种细胞或者与微流控等技术联用来使得BBB模型更加复杂并具有功能性,更加贴近体内环境的同时,且能够维持更久的屏障功能,更适合于药物早期研发的高通量筛选。体内渗透性评价方法也从简单的测定全血或脑组织中的药物浓度到实行原位脑灌注或利用微透析技术开展的脑微透析法,可以实时监测脑内药物浓度变化,使实验结果更加接近药物真实渗透情况。体外渗透性评价方法由于其构造的环境与体内实际BBB环境有所差距,得到的结果不能代表药物真实BBB渗透性,但是可以作为动物体内试验的参考。体内渗透性实验评价方法操作较为复杂,更适用于创新药物的临床前开发或更深入的机制研究。BBB模型在未来的发展趋势将是体外模型在易操作、成本低的基础上更加贴近脑内微环境,使所得到的实验数据更符合实际情况;体内模型将尽可能简化操作、降低成本,从而扩大使其在药学研究中的应用范围。建立和使用更加合理优化的体外

BBB模型,并结合动物体内BBB模型药物的渗透结果,从而全方位了解药物的真实BBB渗透情况。BPC概念的提出,通过将高通量的体外方法(PAMPA)和体内方法(脑匀浆透析技术)结合起来,同时具有低成本、高通量等特点,可以较好地预测化合物的原位BBB渗透率。随着用于创建BPC的化合物总数的增加,将在未来有助于跨BBB类及CNS类药物的研发。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Palmiotti C A, Prasad S, Naik P, et al. *In vitro* cerebrovascular modeling in the 21st century: Current and prospective technologies [J]. *Pharm Res*, 2014, 31 (12): 3229-3250.
- [2] Pardridge W M. Blood-brain barrier endogenous transporters as therapeutic targets: A new model for small molecule CNS drug discovery [J]. *Expert Opin Therap Targets*, 2015, 19(8): 1059-1072.
- [3] 周俊杰, 刘晓东. 血脑屏障及其体外模型研究进展 [J]. *药学进展*, 2020, 44(11): 828-836.  
Zhou J J, Liu X D. Research progress of the blood-brain barrier and its *in vitro* models [J]. *Adv Pharm*, 2020, 44 (11): 828-836.
- [4] Thomsen L B, Burkhardt A, Moos T. A triple culture model of the blood-brain barrier using porcine brain endothelial cells, astrocytes and pericytes [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134765.
- [5] Seiler P. The simultaneous determination of partition coefficients and acidity constant of a substance [J]. *Eur J Med Chem*, 1974, 9(6): 665-666.
- [6] von Geldern T W, Hoffman D J, Kester D J, et al. Azole endothelin antagonists. 3. using  $\Delta\log P$  as a tool to improve absorption [J]. *J Med Chem*, 1996, 39(4): 982-991.
- [7] 李楠, 叶英杰, 杨明, 等. 平行人造膜通透性测定方法(PAMPA)在吸收研究中的应用 [J]. *中药与临床*, 2011, 2 (1): 28-30.  
Li N, Ye Y J, Yang M, et al. The application of parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) in the research of drug absorption [J]. *Pharm Clin Chin Mater Med*, 2011, 2(1): 28-30.
- [8] Di L, Kerns E H, Fan K, et al. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier [J]. *Eur J Med Chem*, 2003, 38(3): 223-232.
- [9] Dagenais C, Avdeef A, Tsinman O, et al. P-glycoprotein deficient mouse in situ blood-brain barrier permeability

- and its prediction using an in combo PAMPA model [J]. Eur J Pharm Sci, 2009, 38(2): 121-137.
- [10] Tsinman O, Tsinman K, Sun N, et al. Physicochemical selectivity of the BBB microenvironment governing passive diffusion -Matching with a porcine brain lipid extract artificial membrane permeability model [J]. Pharm Res, 2011, 28(2): 337-363.
- [11] 付莹, 吕金鹏, 李文建, 等. 血脑屏障渗透模型 PAMPA 的构建及其条件优化 [J]. 常州大学学报: 自然科学版, 2019, 31(4): 86-92.
- Fu Y, Lu J P, Li W J, et al. Construction of the blood-brain barrier permeability model PAMPA and optimization of its conditions [J]. J Changzhou Univ: Nat Sci Ed, 2019, 31(4): 86-92.
- [12] 周杰彬, 邓春梅, 施晓柯, 等. 原小檗碱衍生物诱导急性淋巴白血病细胞凋亡活性及 PAMPA 研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2016, 55(5): 66-72.
- Zhou J B, Deng C M, Shi X K, et al. Studies on the apoptosis activity and PAMPA induced by protoberberine derivatives in acute lymphoblastic leukemia cells [J]. J Sun Yat-sen Univ: Nat Sci Ed, 2016, 55(5): 66-72.
- [13] 张潮, 刘志军, 李艳冰, 等. 靶向抗肿瘤药 *N*-(*N*-苄氧羰基甘氨酸脯氨酸)丙卡巴肼(*Z*-GP-Pcb)的环境友好合成及其透过血脑屏障活性评价 [J]. 有机化学, 2020, 40(2): 536-540.
- Zhang C, Liu Z J, Li Y B, et al. Environmentally friendly synthesis of targeted antitumor drug *N*-(*N*-benzyloxycarbonylglycylprolyl) procarbazine (*Z*-GP-Pcb) and evaluation of its activity through the blood-brain barrier [J]. Organ Chem, 2020, 40(2): 536-540.
- [14] Milica R, Teodora D, Darija O, et al. Application of *in vitro* PAMPA technique and *in silico* computational methods for blood-brain barrier permeability prediction of novel CNS drug candidates [J]. Eur J Pharm Sci, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106056>.
- [15] Wu B L, Hao Y M, Chen Y, et al. Research on the structure-activity relationship of caffeate derivatives as neuroprotective agents [J]. J Chin Pharm Sci, 2019, 28(9): 615-626.
- [16] Simon A, Darcsi A, Kéry Á, et al. Blood-Brain Barrier Permeability Study of Ginger Constituents [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 1doi:10.1016/j.jpba.2019.112820.
- [17] 姜波, 刘伟, 金晓玲, 等. 药物跨血脑屏障转运的实验模型研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(4): 652-657.
- Jiang B, Liu W, Jin X L, et al. Research progress in experimental models of drug transport across the blood-brain barrier [J]. J Int Pharm Res, 2016, 43(4): 652-657.
- [18] 王利民, 姬从花, 孟强. 高温诱导基质金属蛋白酶 9 对体外血脑屏障模型 claudin-1 的影响 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2017, 19(9): 979-983.
- Wang L M, Ji C H, Meng Q. The effect of matrix metalloproteinase-9 induced by high temperature on claudin-1 in an *in vitro* blood-brain barrier model [J]. Chin J Geriatr Cardiovasc Cerebrovasc Dis, 2017, 19(9): 979-983.
- [19] Malina K C 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.
- [20] Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises [J]. Develop Cell, 2011, 21(2): 193-215.
- [21] 单雅楠, 王舒宁, 董柏茹, 等. 十溴联苯醚对血脑屏障体外模型通透性的影响 [J]. 山东医药, 2020, 60(29): 32-35.
- Shan Y N, Wang S N, Dong B R, et al. The effect of decabromodiphenyl ether on the permeability of blood-brain barrier *in vitro* model [J]. Shandong Med, 2020, 60(29): 32-35.
- [22] 杜萌, 郑国侠, 王云华. 微流控芯片技术在血脑屏障模型构建中的应用进展 [J]. 山东医药, 2018, 58(27): 94-96.
- Du M, Zheng G X, Wang Y H. Application progress of microfluidic chip technology in the construction of blood-brain barrier model [J]. Shandong Med, 2018, 58(27): 94-96.
- [23] Jeong S, Kim S, Buonocore J, et al. A three-dimensional arrayed microfluidic blood-brain barrier model with integrated electrical sensor array [J]. IEEE Transact Biomed Engin, 2018, 65(2): 431-439.
- [24] 王伯松, 郭安臣, 王群. 体外血脑屏障模型的研究进展及其在新药研发中的作用 [J]. 中国医药指南, 2019, 17(14): 54-58.
- Wang B S, Guo A C, Wang Q. Research progress of *in vitro* blood-brain barrier model and its role in new drug development [J]. Guide China Med, 2019, 17(14): 54-58.
- [25] Shi D, Mi G, Bhattacharya S, et al. Optimizing superparamagnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers using an *in vitro* blood-brain barrier model [J]. Int J Nanomed, 2016, 11: 5371-5379.
- [26] Edmondson R, Broglie J J, Adcock A F, et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cellbased biosensors [J]. Assay Drug Develop Technol, 2014, 12(4): 207-218.
- [27] Tibbitt M W, Anseth K S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture [J]. Biotechnol Bioengin, 2009, 103(4): 655-663.

- [28] Agathe F, Yasuhiro N, Yukari S M, et al. An *in vitro* self-organized three-dimensional model of the blood-brain barrier microvasculature [J]. *Biomed Mater*, 2020, 16(1): 015006.
- [29] 曲恒燕, 关勇彪, 袁本利. 大鼠原位脑灌注实验技术方法的建立 [J]. *毒理学杂志*, 2006, 20(1): 44-46.  
Qu H Y, Guan Y B, Yuan B L. Establishment of experimental technique of *in situ* cerebral perfusion in rats [J]. *J Toxicol*, 2006, 20(1): 44-46.
- [30] 张秀琴. 中药成分血脑屏障渗透性的计算预测研究及验证 [D]. 杭州: 浙江大学, 2017.  
Zhang X Q. Calculation and verification of blood-brain barrier permeability of traditional Chinese medicine components [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.
- [31] 李 豪, 何 林, 高原雪, 等. 微透析法测定脑缺血损伤后黄芩苷、栀子苷及兴奋性氨基酸含量变化 [J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(1): 107-112.  
Li H, He L, Gao Y X, et al. Determination of Baicalin, Geniposide and Excitatory Amino Acid Content Changes after Cerebral Ischemia Injury by Microdialysis [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2019, 35(1): 107-112.
- [32] Kalvass J C, Maurer T S, Pollack G M. Use of plasma and brain unbound fractions to assess the extent of brain distribution of 34 drugs: Comparison of unbound concentration ratios to P-glycoprotein efflux ratios [J]. *Drug Metabol Disposit*, 2007, 35(4): 660-666.

[责任编辑 李红珠]