

人脐带间充质干细胞对传统胎盘屏障模型屏障功能的影响及作用机制

韩巧巧^{1, 2}, 王 泽^{2*}, 郭宇竹³, 孙英辉^{4, 5}, 赵天宇², 慈小燕^{4, 5}, 崔 涛^{2, 5}, 傅 鹏^{1*}, 伊秀林^{4, 5}, 闫凤英^{2, 4, 5}

1. 安徽医科大学 药学院, 安徽 合肥 230032

2. 天津药物研究院有限公司, 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室, 天津 300301

3. 澳门科技大学 药学院, 澳门 999078

4. 天津市细胞技术创新中心, 天津和创生物技术有限公司, 天津 300301

5. 中国医学科学院 药物代谢新技术创新单元, 北京 100730

摘要: 目的 通过构建体外胎盘屏障模型, 研究人脐带间充质干细胞(hUC-MSC)对传统胎盘屏障模型功能的影响及其可能的分子机制。方法 将hUC-MSC、人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和人滋养层细胞(HTR-8)共同培养于transwell中建立体外胎盘屏障模型, 设置对照组(HUVEC+HTR-8)、forskolin组(HUVEC+HTR-8+forskolin)、MSC组(HUVEC+HTR-8+hUC-MSC)、MSC+forskolin组(HUVEC+HTR-8+hUC-MSC+forskolin), 通过测量跨膜电阻值、荧光黄CH的渗透性以及P-糖蛋白(P-gp)的活性, 评估各组体外胎盘屏障模型的功能; 利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western blotting检测各组体外胎盘屏障模型中P-gp、紧密连接蛋白5(Claudin-5)、闭合小环蛋白-1(ZO-1)、ZO-2、血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)的mRNA及蛋白表达水平; 利用LC-MS/MS检测阿替洛尔、米诺地尔、美托洛尔3种渗透性工具药透过各组体外胎盘屏障模型的表现渗透系数(P_{app}), 验证模型的功能完整性。结果 与对照组相比, forskolin、MSC、MSC+forskolin组的跨膜电阻值均显著增高($P<0.05, 0.001$)、P-gp外排功能均增强、荧光黄的 P_{app} 值均显著降低($P<0.05, 0.01, 0.001$), 且二者联用后作用效果尤为显著, 表明该模型具备完整的屏障功能, 且MSC+forskolin屏障功能最好; qRT-PCR和Western blotting结果显示, 与对照组相比, forskolin组P-gp、ZO-1、ZO-2、CD31的表达显著增加($P<0.05, 0.01, 0.001$), MSC组P-gp、Claudin5、ZO-1和CD31的表达也显著增加($P<0.05, 0.01, 0.001$); 联合应用后, 各蛋白的mRNA及蛋白表达水平均更显著增加($P<0.01, 0.001$), 表明hUC-MSC增强传统胎盘屏障功能; 与对照组相比, 各实验组的 P_{app} 值均降低, MSC+forskolin组3个工具药均差异显著, 美托洛尔差异最显著。结论 hUC-MSC通过增强传统胎盘屏障模型中紧密连接蛋白和外排蛋白的表达, 进一步增强了传统胎盘屏障模型的屏障功能。

关键词: 人脐带间充质干细胞; 人脐静脉内皮细胞; 人滋养层细胞; 胎盘屏障; P-糖蛋白

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)05-1002-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.05.010

Mechanisms of human umbilical cord mesenchymal stem cells enhancing barrier function of traditional placental barrier models

HAN Qiaoqiao^{1, 2}, WANG Ze², GUO Yuzhu³, SUN Yinghui^{4, 5}, ZHAO Tianyu², CI Xiaoyan^{4, 5}, CUI Tao^{2, 5}, FU Peng¹, YI Xiulin^{4, 5}, YAN Fengying^{2, 4, 5}

1. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

2. National Key Laboratory of Drug Gability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co., Ltd., Tianjin 300301, China

3. School of Pharmacy, Macau University of Science and Technology, Macau 999078, China

收稿日期: 2024-01-31

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目(2019-I2M-5-020); 天津市“项目+团队”重点培养专项资助项目(创新类)(XC202030); 天津市科技计划项目细胞制品的成药性及转化研究(23ZGCXQY00050); 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室项目(712023001)

第一作者: 韩巧巧, 女, 硕士研究生, 研究方向药动学。E-mail: 17856912812@163.com

*共同通信作者: 傅 鹏, 男, 研究员, 硕士生导师。E-mail: fupeng1228@126.com

王 泽, 男, 主要从事药动学工作。E-mail: wangze9452@163.com

4. Tianjin HeChuang Biotechnology Co., Ltd., Tianjin Cell Technology Innovation Center, Tianjin 300301, China
5. Research Unit for Drug Metabolism, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Abstract: Objective To investigate the effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSC) on the function of the traditional placental barrier model and its molecular mechanism by constructing an *in vitro* placental barrier model. **Methods** hUC-MSC, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and human trophoblast cells (HTR-8) were co-cultured in a transwell to establish an *in vitro* placental barrier model. The experiment included the following groups: HUVEC+HTR-8 (control group), HUVEC+HTR-8+forskolin (forskolin group), HUVEC+HTR-8+MSC (MSC group), and HUVEC+HTR-8+MSC+forskolin (MSC+forskolin group). By measuring the transmembrane resistance, permeability of fluorescent dye CH, and the activity of P-gp, we assessed the functionality of the *in vitro* placental barrier models in each group. Using real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting, we detected the mRNA and protein expression levels of the efflux protein P-gp, as well as the tight junction proteins Claudin5, ZO-1, ZO-2, and CD31 in the *in vitro* placental barrier model of each group. Additionally, LC-MS/MS was used to detect the apparent permeability coefficient (P_{app}) of atenolol, minoxidil, and metoprolol, three drugs with different permeabilities, to validate the integrity of the model. **Results** Compared with control group, the transmembrane resistance values of forskolin, MSC and MSC+forskolin groups were significantly increased ($P < 0.05, 0.001$), the effection function of P-gp was enhanced, and the P_{app} value of fluorescence yellow was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The combined effect of the two was particularly significant, indicating that the model had complete barrier function, and MSC+forskolin had the best barrier function. qRT-PCR and Western blotting results showed that compared with control group, the expressions of P-gp, ZO-1, ZO-2 and CD31 in forskolin group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and the expressions of P-GP, Claudin5, ZO-1 and CD31 in MSC group were also significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and after combined application, the mRNA and protein expression levels of each protein were significantly increased ($P < 0.01, 0.001$), indicating that hUC-MSC enhanced the traditional placental barrier function. Compared with control group, P_{app} values of all experimental groups were decreased, and there were significant differences among the three instrumental drugs in MSC+forskolin group, the most significant difference was metoprolol. **Conclusion** This study revealed the molecular mechanisms by which MSC enhance the expression of tight junction proteins and efflux proteins in the traditional placental barrier model, thereby enhancing the barrier function of the traditional placental barrier model.

Key words: human umbilical cord mesenchymal stem cells; human umbilical vein endothelial cells; human trophoblast cells; placental barrier; P-gp

胎盘屏障是一种重要的生物屏障,位于胎盘绒毛组织和子宫血窦之间,由内皮细胞、滋养细胞和两者之间的基底膜组成^[1]。胎盘屏障的主要功能是防止胎儿和母体间的血液混合,保护胎儿免受母体免疫系统攻击和感染^[2]。从生理功能上,胎盘屏障不仅能够调节母亲和胎儿之间各种内源性和外源性物质的交换,还具有防御功能,能够阻挡病毒、细菌等有害物质^[3]。药物早期研究中使用的传统胎盘屏障模型是由滋养层细胞和内皮细胞共培养建立的^[1]。最新的研究显示,人脐带间充质干细胞(hUC-MSC)具有促进血管内皮细胞增殖、促细胞迁移,诱导细胞紧密连接蛋白表达的能力^[4]。为进一步探索hUC-MSC对胎盘屏障模型功能的影响机制,为体外药物评价提供更接近人体正常生理功能的评价体系,在本研究中,将hUC-MSC与传统胎盘屏障模型细胞共培养,构建屏障能力更强的体外共培养模型。

细胞中紧密连接是上皮和上皮细胞间形成的细胞旁屏障,是影响屏障通透性的关键因素^[5],其中闭合小环蛋白(ZOs)是细胞-细胞接触的关键分子,是紧密连接的重要调控因子^[6]。在正常胎盘中,ZOs主要定位于合胞体的顶端、合胞体与绒毛滋养层细胞之间的接触中,也定位于胎儿血管内皮中,ZOs参与了胎盘的正常发育,维持了不同组织成分的功能^[7]。血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)可调节内皮细胞的通透性,可促进内皮细胞完整性,CD31的表达越高,细胞表现出更强的稳态屏障功能^[8]。hUC-MSC不仅具有多向分化潜能,而且可以旁分泌多种生物活性因子,对血管内皮细胞的增殖、迁移、成管等生物学行为有重要的影响^[9]。有研究表明hUC-MSC分泌的外泌体能够诱导细胞中CD31、紧密连接蛋白5(Claudin-5)和ZO-1的表达^[10-11]。文献报道长期使用腺苷酸环化酶激活剂forskolin不仅可以促进滋养层细胞的合胞化,还能

通过调节 ZO-1 和 P-糖蛋白(P-gp)的表达水平影响胎盘屏障的药物通透性,对维持屏障的紧密性、防御有害物质进入胎儿体内具有重要作用^[12]。

本研究利用 transwell 和细胞共培养技术,通过人脐静脉内皮细胞(HUVEC)、人绒毛膜滋养层细胞(HTR-8)与 hUC-MSC 共培养,建立与体内生理条件更相似的胎盘屏障模型,阐明了 hUC-MSC 对胎盘屏障功能的影响和可能作用机制,该模型可为孕期用药对胎儿的安全性研究提供更有效的评价方法。

1 材料

1.1 药品与试剂

美托洛尔(MCE公司,批号 122513,规格 50 mg,质量分数 $\geq 99.0\%$);阿替洛尔(MCE公司,批号 C2303185,批号 1 g,质量分数 $\geq 99.0\%$);米诺地尔(阿拉丁公司,批号 G1717005,规格 1 g,质量分数 $\geq 99.0\%$);forskolin(腺苷酸环化酶激活剂,MCE公司,批号 HY-15371,规格 10 mg,质量分数 $\geq 99.0\%$);荧光黄 CH(Sigma公司,批号 2670479,质量分数 $\geq 98.0\%$);罗丹明 123(Sigma公司,批号 R8004,质量分数 $\geq 98.0\%$);奎尼丁(Sigma公司,批号 10138583,质量分数 $\geq 98.0\%$);ECL 发光液(上海碧云天生物技术有限公司,批号 111921220509);无酶无菌水(Solarbio公司,批号 20200813);Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche公司,批号 4897030001);FastStart Universal SYBR Green Master(Roche公司,批号 57313500)。

1.2 主要仪器

倒置显微镜(日本 Olympus 公司);细胞电阻仪(美国 WPI 公司);LightCycler 480 高通量实时荧光定量 PCR(罗氏公司);电泳/转膜槽(Bio-Rad 公司);超灵敏全自动成像分析仪(美国 Protein Simple 公司);台式高速离心机(Eppendorf 公司);酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);液质联用仪(美国 SCIEX 公司)。

1.3 细胞株

hUC-MSC 由天津和创生物技术有限公司提供;HUVEC(资源编号 4201PAT-CCTCC00692)购自国家实验细胞资源共享平台;HTR-8 细胞(货号 CL-0765)购自普诺赛生命科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

将 hUC-MSC、HUVEC 和 HTR-8 细胞分别置于含有 10% FBS 和 1% 青、链霉素的 DMEM/F12 培养基、ECM 培养基、RPMI 1640 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂和相对湿度 90%的 CO₂培养箱中培养,待细胞融合度为 80%~90%时用胰酶消化、传代,然后取对数生长期、生长状态良好的细胞用于体外胎盘屏障模型的构建。

2.2 体外胎盘屏障模型的构建

分别将 HUVEC 细胞接种于 transwell 小室聚酯膜的顶侧,HTR-8 细胞接种于 transwell 小室聚酯膜的底侧,hUC-MSC 细胞接种于 transwell 下室底部,建立体外胎盘屏障模型。即将 HTR-8 细胞以 1.0×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种于基质胶包被的 transwell 小室聚酯膜底侧,待细胞贴壁生长后翻转 transwell 置于培养板,小室两侧分别加入相应体积的培养基,置于 37 °C、相对湿度 90%的 CO₂培养箱中继续培养,隔天换液。待 HTR-8 细胞融合率达 85%后在上室内接种 HUVEC(1.0×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$),下室内以 1.0×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种 hUC-MSC 细胞。实验设置对照组(HUVEC+HTR-8)、forskolin 组(HUVEC+HTR-8+forskolin)、MSC 组(HUVEC+HTR-8+hUC-MSC)、MSC+forskolin 组(HUVEC+HTR-8+hUC-MSC+forskolin)(图 1),置于 37 °C、5% CO₂、相对湿度 90%的培养箱中共培养 7 d。

2.3 hUC-MSC 对传统胎盘屏障功能的影响

2.3.1 跨内皮细胞电阻测定 使用 EVOM²跨膜细胞电阻仪分别于培养第 1、3、5、7 天(D1、D3、D5、D7)对 4 组体外共培养模型的跨膜电阻(TEER)进

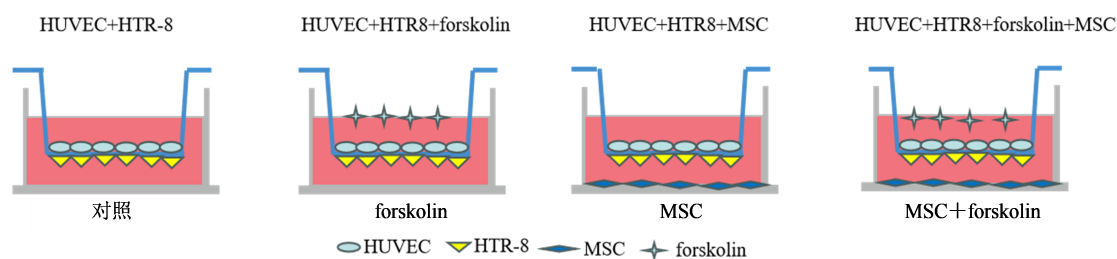


图1 体外胎盘屏障模型的建立

Fig. 1 Establishment of an *in vitro* placental barrier model

行测量和记录,以评估4组胎盘屏障模型的完整性。使用前在transwell的下室和上室中分别加入相应体积的Hank's平衡盐溶液(HBSS)平衡20 min,测量时电极应垂直插入细胞培养板,长臂在小室外侧,短臂在小室内侧,避免电极接触细胞破坏细胞膜,当电阻仪显示数据稳定后记录读数,小室3个方向各测定1次,每组模型3个复孔。

2.3.2 细胞间隙完整性测定 荧光黄CH是细胞旁渗透性药物,因其具有较低的跨膜渗透性,被广泛用作工具药来评价体外屏障模型细胞间隙的完整性。将共培养7 d后的transwell孔板弃去培养基,加入37℃预热的HBSS溶液平衡20 min;取出板子后,在细胞顶侧(AP)加入0.5 mL含荧光黄CH($50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的HBSS溶液,37℃恒温振荡器孵育60 min后吸取转运液,酶标仪测定其中荧光黄CH的浓度。

2.3.3 P-gp功能测定 罗丹明123是跨细胞膜转运药物,是P-gp的外排转运底物,常作为工具药验证模型细胞P-gp的外排功能。将共培养7 d后的transwell孔板弃去培养基,加入37℃预热的HBSS平衡20 min;在细胞AP侧加入0.5 mL含 $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 罗丹明123的给药液,在细胞基底侧(BL)加入1.5 mL HBSS溶液;在细胞AP侧加入0.5 mL的HBSS溶液,在细胞BL侧加入1.5 mL含 $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 罗丹明123的给药液进行双向转运研究。37℃恒温振荡孵育30 min后采集转运液,酶标仪测定其中罗丹明123的浓度,计算表观渗透系数(P_{app}),推测药物透过细胞膜的能力以及药物吸收的速度,以外排率代表药物外排能力的大小,通过外排率可以预测药物在吸收时是否存在药物转运蛋白介导的外排,当所测药物的外排率 ≥ 2 时,表示药物可能为屏障外排转运蛋白的底物。 $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 罗丹明123与奎尼丁(P-gp抑制剂, $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)共同给药后再次进行实验。

$$P_{\text{app}} = (dc/dr \cdot V) / (A \cdot C_0)$$

$$\text{外排率} = P_{\text{app(BP} \rightarrow \text{AP)}} / P_{\text{app(AP} \rightarrow \text{BP)}})$$

dc/dr 为单位时间药物转运量, V 为溶液体积, A 为有效渗透面积, C_0 为初始药物浓度

2.4 hUC-MSC对传统胎盘屏障蛋白表达的影响

2.4.1 hUC-MSC对传统胎盘屏障mRNA表达的影响 将共培养7 d后的transwell小室聚酯膜用镊子取出,加入TRNzol总RNA提取试剂并按照说明书提取总RNA。按Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit逆转录试剂盒说明书制备cDNA,按照

Fast Start Universal SYBR Green Master(Rox)实时定量试剂盒说明书进行*Claudin5*、*ZO-1*、*ZO-2*、*CD31*、*P-gp*和*GAPDH*基因的扩增,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算对照组和实验组mRNA表达差异。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	碱基序列(5'→3')
H- <i>GAPDH</i> -F	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
H- <i>GAPDH</i> -R	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
H- <i>Claudin-5</i> -F	GCTGGATCGCCAATATCGTCATTAC
H- <i>Claudin-5</i> -R	CCAAGCAGGAGCAGGGAAGTG
H- <i>ZO-1</i> -F	ACATTGCCGCCAGCCATCTC
H- <i>ZO-1</i> -R	ATCTATCCACACCATCAGCTTCAGG
H- <i>ZO-2</i> -F	CCAGCACACGAGTTCCAGACC
H- <i>ZO-2</i> -R	TACTCCTCCTCCTCGGCATCAC
H- <i>CD31</i> -F	AAGGTGGTGGAGTCTGGAGAGG
H- <i>CD31</i> -R	CTGGGTGGCATTGAGGTTCATTG
H- <i>P-gp</i> -F	GGTGCTGGTTGCTGCTTACATTC
H- <i>P-gp</i> -R	AGCCTATCTCCTGTGCGCATTATAGC

2.4.2 hUC-MSC对传统胎盘屏障蛋白表达的影响 将共培养7 d后的transwell小室聚酯膜用镊子取出,加入RIPA裂解细胞提取总蛋白,并测定蛋白浓度。采用SDS-PAGE电泳法分离细胞蛋白,湿转法将蛋白转移到PVDF膜,5%脱脂牛奶室温封闭40 min,一抗溶液4℃过夜孵育。TBST溶液洗涤3次,每次5 min,二抗溶液室温孵育1 h, TBST溶液洗涤3次,每次5 min。采用ECL化学发光法曝光成像,Image J软件分析蛋白条带的灰度值。

2.5 hUC-MSC对传统胎盘屏障渗透性的影响

为了验证hUC-MSC对胎盘屏障模型渗透性的影响,采用LC-MS/MS测定不同渗透性的工具药透过胎盘屏障模型的透过量^[13],计算 P_{app} 。在测量TEER值后,弃去transwell孔板中的培养基,加入37℃预热的HBSS溶液平衡20 min;取出板子后,在细胞AP侧分别加入0.5 mL含 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿替洛尔、 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 米诺地尔、 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 美托洛尔的HBSS溶液,BL侧加入1.5 mL预热的HBSS溶液,37℃恒温振荡器孵育30 min后吸取转运液,100 μL 转运液加入400 μL 甲醇溶液,涡旋振荡1 min,14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高速离心10 min;取5 μL 上清液进行LC-MS/MS定量分析。

2.6 统计学分析

实验数据采用 GraphPad Prism 8 统计分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组比较采用独立样本 t 检验,多重比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 体外胎盘屏障完整性评价

3.1.1 TEER 测定 结果显示,随着培养时间的延长,每组体外胎盘屏障模型的 TEER 逐渐增加,且在培养 7 d 时实验组的 TEER 均显著高于对照组 ($P < 0.05, 0.001$),尤其是 MSC+forskolin 组,其 TEER 可达 $180 \Omega \cdot \text{cm}^2$,与对照组相比差异极其显著 ($P < 0.001$),图 2。

3.1.2 细胞间隙完整性测定 各组体外胎盘屏障模型共培养 7 d 后,给予 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 荧光黄 CH 1 h,

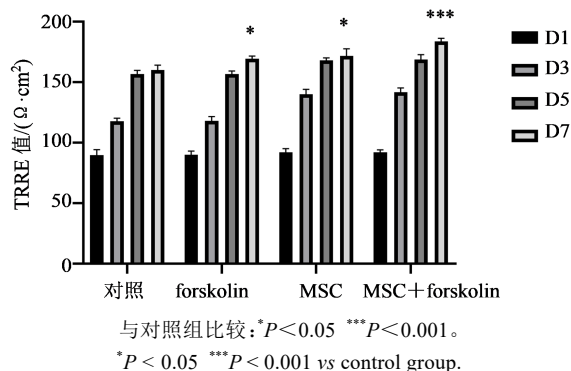


图2 各组体外胎盘屏障模型中细胞电阻值($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 2 TEER values in *in vitro* placental barrier model for each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

酶标仪检测每组体外胎盘屏障模型的荧光黄 CH 的跨膜渗透性,结果显示,与对照组相比,所有实验组均呈现荧光黄 CH 渗透性不同程度的下降 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$),尤其是 MSC 和 forskolin 联用组极显著低于传统胎盘屏障模型 ($P < 0.001$) (表 2)。

表2 荧光黄 CH 在各组体外胎盘屏障模型中的 P_{app} 值($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$P_{\text{app AP} \rightarrow \text{BL}} / (\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$
对照	10.41±0.12
forskolin	9.18±0.38*
MSC	6.73±0.38**
MSC+forskolin	5.29±0.38***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

3.1.3 P-gp 功能测定 胎盘屏障中外排转运蛋白 P-gp 的功能对发挥药物跨膜屏障功能有很大的影响。共培养 7 d 后,给予罗丹明 123 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,给药 30 min 后检测各组 P-gp 的外排功能。结果显示,与对照组相比,各实验组外排活性均有不同程度增强,且添加奎尼丁(P-gp 抑制剂)后,罗丹明 123 的外排率显著降低,明显抑制了 P-gp 蛋白的外排活性,其中 MSC 和 forskolin 联用组的罗丹明 123 的外排率从 2.14 增加至 3.18, P-gp 活性增强了约 1.5 倍(表 3)。

表3 罗丹明 123 在各组体外胎盘屏障模型中双向转运的 P_{app} 值和外排率值($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 P_{app} values and efflux rate values for bidirectional transport of rhodamine 123 in each group in *in vitro* placental barrier model ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	药物	$P_{\text{app}} / (\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$		外排率
		AP→BL	BL→AP	
对照	罗丹明 123	9.85±0.32	21.06±0.86	2.14
	罗丹明 123+奎尼丁	10.23±0.11	12.12±0.54	1.18
forskolin	罗丹明 123	10.28±0.38	31.17±0.39	3.03
	罗丹明 123+奎尼丁	10.50±0.01	11.17±0.02	1.06
MSC	罗丹明 123	8.66±1.79	22.03±1.71	2.54
	罗丹明 123+奎尼丁	9.81±0.42	11.19±0.65	1.14
MSC+forskolin	罗丹明 123	10.54±0.07	33.51±1.60	3.18
	罗丹明 123+奎尼丁	11.25±0.16	12.64±0.58	1.12

3.2 hUC-MSC 对传统胎盘屏障 mRNA 表达的影响

结果显示(图 3),与对照组相比, forskolin 组 P-gp 的 mRNA 表达极显著增加 ($P < 0.001$), ZO1、ZO-2、

CD31 的 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.05, 0.01$); MSC 组 P-gp、Claudin5、ZO-1、CD31 的 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.05, 0.01$); MSC 和 forskolin 联用组 P-gp、Claudin5、ZO-1、CD31 的 mRNA

表达极显著增加($P < 0.001$), ZO-2的mRNA表达显著增加($P < 0.01$)。

3.3 hUC-MSC对传统胎盘屏障蛋白表达的影响

结果显示(图4),与对照组相比, forskolin组 P-gp、Claudin5、ZO-1、CD31的蛋白表达显著增加($P < 0.05$ 、 0.01), ZO-2的蛋白表达极显著增加($P < 0.001$); MSC组 Claudin5、ZO-1的蛋白表达极显著增加($P < 0.001$), P-gp、CD31的蛋白表达显著增加($P < 0.05$ 、 0.01); MSC和 forskolin联用组 Claudin5、ZO-1、ZO-2、CD31的蛋白表达极显

著增加($P < 0.001$), P-gp的蛋白表达显著增加($P < 0.01$)。

3.4 hUC-MSC对传统胎盘屏障渗透性的影响

通过LC-MS/MS检测3种工具药透过各组体外胎盘屏障模型的渗透率,结果显示,与对照组相比,各实验组模型的 P_{app} 值均有所降低,其中MSC和 forskolin联用组下降最为显著,阿替洛尔从10.76下降为8.07($P < 0.01$),米诺地尔从25.48下降为20.90($P < 0.01$),美托洛尔从35.31下降为24.54($P < 0.001$),见表4。

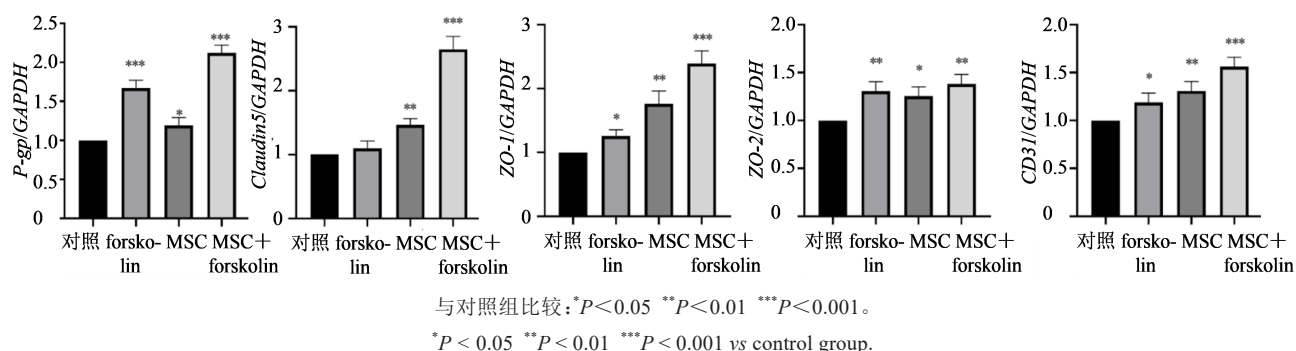


图3 各组体外胎盘屏障模型中 Claudin5、ZO-1、ZO-2、CD31、P-gp mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Claudin5, ZO-1, ZO-2, CD31, and P-gp mRNA expression in each group of *in vitro* placental barrier models ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

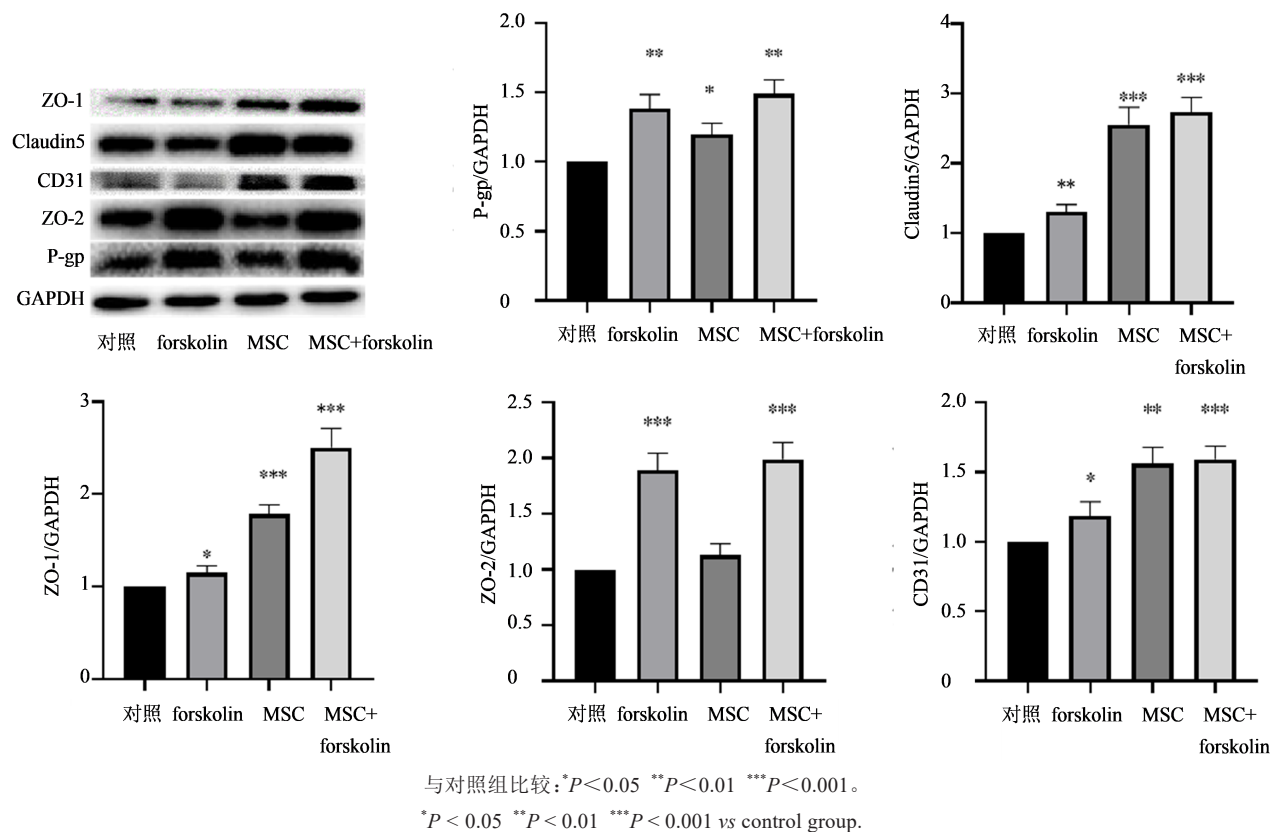


图4 各组体外胎盘屏障模型中蛋白的表达($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Protein expression in each placental barrier model ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

表4 药物通过各组胎盘屏障模型的 P_{app} 值($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 4 P_{app} values of drug across group placental barrier model($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	$P_{app}/(\times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$		
	阿替洛尔	米诺地尔	美托洛尔
对照	10.76 $\pm$ 0.03	25.48 $\pm$ 1.17	35.31 $\pm$ 0.72
forskolin	9.88 $\pm$ 0.01*	23.99 $\pm$ 0.93	31.43 $\pm$ 0.57*
MSC	8.54 $\pm$ 0.02**	21.68 $\pm$ 0.08**	26.67 $\pm$ 0.63***
MSC+forskolin	8.07 $\pm$ 0.04**	20.90 $\pm$ 0.03**	24.54 $\pm$ 0.56***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

4 讨论

选择适当的胎盘屏障模型是孕妇用药毒理学研究和药物安全性评价的重要挑战之一^[14]。研究表明作为研究药物渗透性的体外模型应具备类似生理上真实的细胞结构, HUVEC和HTR-8细胞共培养可模拟体内胎盘屏障的生理结构, 细胞间紧密连接与细胞膜外排蛋白功能表达的完整性是建立体外屏障模型的必备条件^[15]。这种模型有助于更准确地评估药物在体内的渗透性和穿透性, 对于药物研发和胎盘屏障研究具有重要意义。本研究构建并表征了一种由HUVEC、HTR-8、hUC-MSC三重共培养构成的新型胎盘屏障模型, 旨在为胎盘屏障生理学、病理学和药理学研究提供一种可靠的体外工具。本研究使用的transwell培养技术能够开发出更接近真实生理结构的层状微观结构^[16]。将HUVEC细胞培养在transwell小室顶侧, HTR-8细胞培养在小室底侧, 下室培养hUC-MSC细胞, transwell允许HUVEC细胞的足突通过聚酯膜上的微孔, 能够与HTR-8细胞直接接触, hUC-MSC在transwell下室培养所分泌的细胞因子和外泌体等可影响上室细胞, 这可以模仿胎盘屏障的生理结构, 促进胎盘屏障特性形成。本研究主要探讨hUC-MSC对传统胎盘屏障模型的屏障功能产生的影响极其可能的分子机制。研究显示, hUC-MSC细胞能够促内皮细胞增殖, 诱导内皮间紧密连接的形成, 主要是由于其分泌的细胞因子和外泌体可上调传统胎盘屏障中Claudin5、CD31、ZO-1的表达^[17-18], forskolin不仅可促进滋养层细胞的合胞化, 同时还能上调屏障中Claudin5、ZO-1、ZO-2和P-gp的表达, 极大的增强了传统模型的屏障功能。此外, 为进一步验证新型胎盘屏障模型的屏障功能, 选择3种不同程度渗透性的生物药剂学分类系统(BCS)药物用于检测新模型的渗透性^[19]。这3种化合物通常被选作评估其他人体屏障, 如血脑屏障模型和胃肠道模

型^[20-21]。结果显示, 3种化合物透过该新型胎盘屏障的渗透规律基本符合其BCS分类。因次, 充分说明了该新型胎盘屏障模型功能完整, 可作为一种有价值的研究工具, 用于评估更多化合物跨膜屏障的情况。

本研究通过研究hUC-MSC对传统胎盘屏障的积极影响, 建立了具有更强屏障性的新模型, 为体外胎盘屏障模型的研究提供了新思路。此外, 该研究可为孕妇用药对胎儿的安全性评价提供一种可靠的体外细胞模型, 对于指导孕妇临床安全用药具有十分重要的意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Levkovitz R, Zaretsky U, Gordon Z, et al. *In vitro* simulation of placental transport: Part I. Biological model of the placental barrier [J]. Placenta, 2013, 34(8): 699-707.
- [2] Morgan T K. Role of the placenta in preterm birth: A review [J]. Am J Perinatol, 2016, 33(3): 258-266.
- [3] Wong M K, Li E W, Adam M, et al. Establishment of an *in vitro* placental barrier model cultured under physiologically relevant oxygen levels [J]. Mol Hum Reprod, 2020, 26(5): 353-365.
- [4] Wang Y X, Luan S, Yuan Z, et al. The combined use of platelet-rich plasma clot releasate and allogeneic human umbilical cord mesenchymal stem cells rescue glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. Stem Cells Int, 2022, 2022: 7432665.
- [5] Slifer Z M, Blikslager A T. The integral role of tight junction proteins in the repair of injured intestinal epithelium [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(3): 972.
- [6] Van Itallie C M, Anderson J M. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition [J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, 36: 157-165.
- [7] Xu J L, Kausalya P J, Phua D C Y, et al. Early embryonic

- lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(5): 1669-1678.
- [8] Lertkiatmongkol P, Liao D Y, Mei H, et al. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) [J]. *Curr Opin Hematol*, 2016, 23(3): 253-259.
- [9] Zhou Y, Zhou J H, Xu X, et al. Matrigel/umbilical cord-derived mesenchymal stem cells promote granulosa cell proliferation and ovarian vascularization in a mouse model of premature ovarian failure [J]. *Stem Cells Dev*, 2021, 30(15): 782-796.
- [10] Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal L, et al. Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis in vitro [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(14): 1635-1647.
- [11] Li Y Y, Xu Q W, Xu P Y, et al. MSC-derived exosomal miR-34a/c-5p and miR-29b-3p improve intestinal barrier function by targeting the Snail/Claudins signaling pathway [J]. *Life Sci*, 2020, 257: 118017.
- [12] Egawa M, Kamata H, Kushiyama A, et al. Long-term forskolin stimulation induces AMPK activation and thereby enhances tight junction formation in human placental trophoblast BeWo cells [J]. *Placenta*, 2008, 29 (12): 1003-1008.
- [13] Veloutsou, S., Bizani, E., & Fytianos, K. Photo-Fenton decomposition of β -blockers atenolol and metoprolol; study and optimization of system parameters and identification of intermediates[J]. *Chemosphere*, 2014, 107: 180-186.
- [14] Pemathilaka R L, Alimoradi N, Reynolds D E, et al. Transport of maternally administered pharmaceutical agents across the placental barrier *in vitro* [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2022, 5(5): 2273-2284.
- [5] Li Z S, Kurosawa O, Iwata H. A novel human placental barrier model based on trophoblast stem cells derived from human induced pluripotent stem cells [J]. *Tissue Eng Part A*, 2020, 26(13/14): 780-791.
- [16] Yin F C, Zhu Y J, Zhang M, et al. A 3D human placenta-on-a-chip model to probe nanoparticle exposure at the placental barrier [J]. *Toxicol In Vitro*, 2019, 54: 105-113.
- [17] Pan Q W, Kuang X L, Cai S Y, et al. MiR-132-3p priming enhances the effects of mesenchymal stromal cell-derived exosomes on ameliorating brain ischemic injury [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 260.
- [18] Yong H E J, Chan S Y, Chakraborty A, et al. Significance of the placental barrier in antenatal viral infections [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(12): 166244.
- [19] Colclough N, Chen K, Johnström P, et al. Preclinical comparison of the blood-brain barrier permeability of osimertinib with other EGFR TKIs [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(1): 189-201.
- [20] Hakkarainen J J, Pajander J, Laitinen R, et al. Similar molecular descriptors determine the *in vitro* drug permeability in endothelial and epithelial cells [J]. *Int J Pharm*, 2012, 436(1/2): 426-443.
- [21] Nakagawa S, Deli M A, Kawaguchi H, et al. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes [J]. *Neurochem Int*, 2009, 54(3/4): 253-263.

[责任编辑 兰新新]