뇌 내 약물전달 시스템 개발을 위한 혈액-뇌 장벽 세포모델

In vitro Blood-Brain Barrier Models for Studying Brain Targeted Drug Delivery System

최정원 · 박태은 | Jeong-Won Choi · Tae-Eun Park

Department of Biomedical Engineering, Ulsan National Institute of Science and Technology,
UNIST-gil 50, Ulsan 44919, Korea
E-mail: tepark@unist.ac.kr

1. 서론

Blood-brain barrier(BBB; 혈액-뇌 장벽)는 가장 강력한 생체장벽으로서 뇌 기능 유지에 필수적인 혈중 물질만 선택적으로 통과하게 함으로써 뇌의 복잡한 생리를 유지할 수 있도록 돕는 방어 시스템이다. BBB는 뇌혈관 내피세포로부터 형성된 모세혈관과 이를 둘러싼 성상교세포(astrocyte) 및 혈관주위세포(pericyte)로 이루어져 있으며 각 세포들은 BBB 특유의 생체장벽을 견고히 하는데 기여한다. 뇌혈관 내피세포는 타 장기의 내피세포와 다르게 폐쇄연접(tight junction)이 발달되어 있어 300 Da 이상의 친수성 물질의 세포간 통과를 강력히 저해하고 있으며 이를 물리적 장벽기능이라고 한다. 또한 극성화된 내피세포에는 P-glycoprotein, MRP1, MRP4, BCRP 등 다양한 종류의 다제 내출 펌프(efflux pump)가 발달되어 있어 소수성의 약물과 결합함으로써 약물의 뇌조직 투과를 방해하며, 이를 대사적 장벽기능이라고 일컫는다. 성상교세포는 형성된 뇌 모세혈관을 향해 돌기를 뻗어 혈관의 대부분의 표면을 감싼 astrocytic endfeet을 형성하며 최근에는 이러한 endfeet이 BBB에 가해지는 위해요인에 방어해 생체장벽을 유지하는 데 있어 있어 중추역할을 하는 것으로 알려지고 있다.[1] 혈관주위세포는 뇌혈류 조절과 장벽 유지 기능을 담당하며, 특정 유전형의 알츠하이머 환자의(예: APOE4) 혈관주위세포 기능이상이 알츠하이머 주원인으로 제시될 정도로 정상적인 BBB 기능에 필수적인 세포이다. BBB는 뇌조직의 항상성에 중요한 역할을 하지만 대부분의 뇌질환 약물들의 뇌혈관 통과를 가로막는다. 따라서 혈액-뇌 장벽을 극복할 수 있는 약물전달 시스템이 뇌질환 약물의 개발만큼이나 뇌질환 정복의 큰 과제로 손꼽히고 있다.

특히 그동안 고분자를 이용한 뇌 내 약물전달이 각광받아왔는데, 약물을 고분자와 결합시키거나 캡슐 형태로 만듬으로써 약물을 보호할 뿐만 아니라 고분자 나노입자 크기, 입자 표면의 물리화학적 특성을 유연하게 조절하여 혈액-뇌 장벽 극복을 위한 다양한 전략을 도입할 수 있기 때문이다. 뇌 내 약물전달을 위해 이용되는 고분자로서 합성고분자, 단백질, 리포솜(liposome), 마이셀(micelle) 등이 있으며 대표적으로는 BBB 표적 분자를 도입함으로써 수용체기반 트랜스사이토시스(transcytosis)로 BBB를 통과하는 트로이 목마 전략을 취하고 있다. 이는 약물과 결합하거나 담지한 고분자입자가 뇌혈관 내피세포에 발현된 수용체나 운송단백질을 표적함으로써 정단부에서 세포내입(endocytosis)되게 하고 바닥막(basement membrane)과 맞닿은 기저측부로 방출되어 뇌 내로 유입시키는 방법이다.

Author

최정원

2019 울산과학기술원 생명공학과 (학사)
2019-현재 울산과학기술원 바이오메디컬공학과 (석박사통합과정)

박태은

2011 서울대학교 동물생명공학과 (학사)
2015 서울대학교 동물생명공학과 (박사)
2015-2017 Wyss Institute at Harvard University
2017-현재 울산과학기술원 바이오메디컬공학과 조교수

이러한 고분자 약물전달 시스템의 효율적인 개발을 위해서는 다이나믹한 BBB의 장벽기능이 구현된 검증 플랫폼이 필수적이다. 많은 연구팀들에서 마우스와 같은 실험동물에 고분자 입자를 투여하고 뇌에 전달된 약물/전달체 수준을 분석화학적 방법 혹은 이미징 기술을 통해 분석하는 방법을 취하고 있다. 그러나 실험동물의 BBB는 인체 BBB와 물리적, 대사적 장벽 수준에서 분명한 차이가 있다는 한계점을 가진다. 본 특집에서는 인체 BBB 세포기반 플랫폼을 소개하고 각각의 플랫폼의 특성 및 장단점에 대해 논하고자 한다.

2. 본론

2.1 실험동물과 인체 BBB의 차이

실험동물과 인체 BBB의 종간차에 의한 연구결과의 오류를 바로잡고자 종간 BBB 특성 및 주요 기능 관련 단백질에 관한 연구가 진행되어왔다.

BBB의 대사적 장벽과 관련된 efflux pump 단백질의 발현 수준을 마우스와 인체 뇌혈관 내피세포에서 프로테오믹스 분석한 결과 BCRP는 인체 BBB에서 마우스에 비해 1.85배 높고 P-glycoprotein은 0.43배, MRP4는 0.12배로 마우스에 비해 낮다는 발표가 있다.[2] 다양한 약물의 뇌 투과를 저해하는 P-glycoprotein 활성을 종간 분석한 결과, 고혈압 치료제로 알려진 diltiazem의 clearance가 개(dog)에서 0.1, 인체에서 0.7, 그리고 레뜨(rat)에서 2.1 mg/mg/h임을 확인함으로써 종간 차이가 있음을 보여주었다.[3] 다른 연구에서는 P-glycoprotein의 기질인 verapamil의 efflux ratio를 분석하였다. 여기서 efflux ratio는 P-glycoprotein가 유전자 제거되었을 때 세포에 흡수되는 약물의 상대적인 비율이다. 마우스 10, 레뜨 6, 개 9, 원숭이 4, 인체 4로 분석되었는데[4], 이는 인체 BBB의 P-glycoprotein 활성이 상대적으로 가장 낮음을 보여준다.

그 밖에 물질 수송체(transporter) 중 GLUT3(glucose transporter 3)는 인체 BBB에서 7.25배 높은 반면 GLUT1 (glucose transporter 1)은 마우스와 유의적 차이가 없었다.[2] 흥미롭게도 혈액-뇌 장벽 약물전달 전략으로 표적 대상이 되는 TfR1(Transferrin receptor protein 1)은 인체 BBB에서 마우스에 비해 0.4배로 낮은 수준임을 보였다. 반면 LRP1(low density lipoprotein receptor-related protein 1)이나 INSR(insulin receptor)는 유의적 차이가 없었다.[2] 위 연구들은 BBB의 대사적 장벽의 기능과 수용체, 물질 수송체 발현에 있어 종간 차이가 매우 크므로 실험동물을 이용한 약물전달 연구에 오류가 있을 수 있다는 점을 보여준다. 또한 이는 뇌 내 약물전달 연구를 위해서는 인체 BBB 모델이 반드시 필요함을 시사한다.

2.2 인체 BBB 모델을 위한 세포선정

BBB의 주요 기능을 담당하는 뇌혈관 내피세포 배양체를 이용해 고분자 약물 전달체의 흡수에 대해 연구한 사례가 상당히 많다. 인간 뇌혈관 내피세포 중 가장 많이 이용되는 불멸화 세포주 hCMEC/D3는 무한대로 증식할 수 있고 배양하기 까다롭지 않으면서도 인체 BBB 표현형을 어느 정도 유지하고 있어 가장 많이 이용되어왔다.[5] 이 세포는 환자로부터 수술로 얻은 뇌 조직으로부터 뇌혈관 내피세포를 분리 배양하고, hTERT와 SV40 large T antigen 유전자를 도입함으로써 불멸화되었다.[5] 위 세포주는 primary 뇌혈관 내피세포와 BBB 특유의 유전자 발현 패턴이 유사함이 확인되었으나, claudin-5, occludin과 같은 장벽 단백질과 glut-1, insulin receptor와 같은 수용체의 발현은 낮았다.[5] 또한, 세포 monolayer의 장벽 수준을 알 수 있는 transendothelial electrical resistance(TEER)를 측정하였을 때 생체수준(1,000 $\Omega\cdot cm^2$)을 크게 밑도는 35-50 $\Omega\cdot cm^2$ 수준이다.[5]

대부분 인위적으로 불멸화 시킨 세포주보다는 조직으로부터 직접 분리한 primary 세포배양이 세포의 고유 기능을 더욱 잘 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 primary 인체 뇌 조직을 구하기 어려울 뿐 아니라 primary 뇌혈관 내피세포 배양 후 뇌혈관 내피세포 간 폐쇄연접이 약화되기 때문에 여전히 낮은 TEER 값을 보인다(100 $\Omega\cdot cm^2$ 미만).[5] 세포주와 primary 세포에서 보이는 낮은 장벽값(TEER)은 내피세포간 폐쇄연접이 약하여 생체와 다르게 세포 간 물질 이동이 자유로울 수 있다는 점을 시사한다. 이 경우 뇌 내 약물전달 연구 시 세포간 경로를 통해 약물이나 고분자 약물 전달체가 새어 나갈 수 있으므로 정확한 분석이 어려울 수 있다.

2014년 Shusta 그룹에서 발표한 iPSC(induced pluripotent stem cell) 기반 뇌혈관 내피세포 분화방법은 생체수준의 물리적 장벽과 일부 대사적 장벽을 구현할 수 있도록 하였다. 분화과정에 2주 이상이 걸리고 iPSC 세포주마다 효율이 다를 가능성이 있으며, 분화된 내피세포의 기능 유지가 단시간(약 24시간)만 확보될 수 있다는 문제가 있다. 그러나 생체수준의 물리적 장벽 덕분에 고분자 약물 전달체가 세포간 경로로 빠져나가는 오류를 제거할 수 있어 보다 정확한 분석이 이루어질 수 있다.[6]

이와 더불어 중요한 BBB 구성 세포로서 성상교세포와 혈관주위세포가 있으며, 또한 마찬가지로 불멸화된 세포주, 상용화된 일차 세포, iPSC 분화 유도된 세포모델이 있다.

2.3 3차원 트렌스웰 기반 BBB 모델

BBB의 세포 구성을 모사하고 내피세포 사이의 폐쇄연접을 효율적으로 조절하기 위해 트렌스웰(transwell) 시스템이 BBB 모델 구축에 널리 사용되어 왔다.[7] 특히 트렌스웰은 내피세포의 극성을 유도하여 정단부와 기저측부를 모사하

기에 적절하다. 대표적인 BBB 모델 구축 방법으로 1) 트렌스웰 다공성 막에 뇌혈관 내피세포를 배양하여 monolayer를 형성하는 방법 2) 이에 더하여 성상교세포나 혈관주위세포를 하단 챔버에 공배양 하는 방법 3) 하단 챔버가 아닌 다공성막 하단부에 접촉하여 공배양한 모델, 그리고 4) 복합 공배양 모델이 있다(그림 1).[7] 트렌스웰에 내피세포만 배양한 모델은 성상교세포과 혈관주위세포와의 측분비(paracrine signaling)에 의한 성숙화를 유도할 수 없기 때문에 BBB의 장벽기능이 상대적으로 낮다고 알려져 있다. 두 번째 방법인 하단 챔버에 성상교세포와 혈관주위세포를 공배양 한 모델은 측분비로 인한 장벽 기능 성숙화가 유도되지만, 내피세포와 물리적으로 가깝지 않기 때문에 나노입자의 내피세포와 이를 둘러싼 성상교세포 및 혈관주위세포의 통과효율까지 직접적으로 연구할 수 없다. 세 번째 방법은 측분비와 세 가지 주요 BBB 세포의 물리적 접근성이 어느 정도 확보될 수 있어 생체와 더 유사한 트렌스웰 기반 BBB 모델로 제안되고 있다. 네 번째 방법은 하단 챔버와 다공성막 하단 부분을 모두 이용해 공배양 하는 방법으로서 예를 들어 혈관주위세포를 하단 챔버에, 그리고 성상교세포를 다공성 막 하단 부분에 배양하여 공간적으로 두 종류의 세포를 분리된 모델도 가능하다.

트렌스웰을 이용한 고분자 약물전달 연구예로서 Moghimi 그룹은 파지 디스플레이를 통해동정한 BBB 통과 펩타이드를 코어-쉘 나노입자로 형성하여 표적능을 향상시킨 후 BBB 통과율을 hCMEC/D3 단일로 구성된 트렌스웰 모델로 규명하였다.[8] 위 세포주를 약 7일간 배양한 결과 40 $\Omega \cdot cm^2$ 가량의 TEER 값을 나타냈으며, 나노입자의 처리가 TEER 변화에 영향을 미치지 않는 것으로 볼 때 세포독성에 안전함을 나타냈다. 또한 트렌스웰 상단부에 FAM으로 수식된 나노입자를 처리한 결과 BBB 표적능이 있는 펩타이드로 만들어진 나노입자의 BBB 통과효율이 FAM에 비해 약 10배 이상 높음을 하단챔버의 형광 intensity를 분석해 확인하였다. 이렇듯 대부분의 트렌스웰 BBB 모델을 이용한 약물전달 연구가 나노입자의 독성과 통과효율을 분석하는데 집중되어있다. 더 나아가서는 나노입자 표면의 표적 리간드의 수용체 결합 메커니즘을 연구하는 것도 가능하다.[8] 예를 들어 나노입자에 수식된 표적 리간드(예: lactoferrin)를 BBB 트렌스웰 모델 상단부에 전처리하여 수용체(예: lactoferrin receptor)를 차지하게 할 수 있다. 나노입자를 BBB 트렌스웰 모델에 처리하였을 때 리간드 전처리에 의해 BBB 통과율이 감소하게 되면 나노입자가 실질적으로 해당 수용체와의 상호작용에 의해 transcytosis하는 것으로 증명할 수 있다.

먼저 트렌스웰 BBB 모델을 구축함에 앞서 고분자 나노입자의 디자인을 고려해야 할 것이다. 예를 들어, 표적 리간드와 결합하는 수용체가 사용하고자 하는 뇌혈관 내피세포에 발현하는지 여부를 미리 검증해야 하며, 나노입자의 사이즈가 작은 경우 BBB 모델의 낮은 장벽값로 인해 내피세포 사이로 통과하는 등 생체 BBB와 다른 결과를 보일 수 있음을 인지해야 한다. 일반적으로 성상교세포와 혈관주위세포가 뇌혈관 내피세포의 장벽기능과 더불어 물질수송체와 수용체의 발현을 향상시킬 수 있다. 따라서 올바른 세포 선정과 배양조건 최적화는 생체 BBB와 유사한 트렌스웰 BBB 모델의 구축에 필수적이다.

또한 트렌스웰 선정 시 배양할 세포, 고분자 입자의 기계화학적 특성에 따라 다양한 멤브레인 소재(예: PET(polyethylene terephthalate), PC(polycarbonate)), pore의 크기(0.4 μm, 3 μm, 8 μm, 10 μm), pore의 밀도, 광학적 특성을 고려해야 한다. 예를 들어 고분자입자의 크기보다 pore 크기가 충분히 커야 하며, 뇌혈관 내피세포주에 따라 3 μm 이상의 pore 크기에서는 세포 자체가 충분한 접착면을 확보하지 못하여[9] 안정적인 monolayer 형성이 어렵다. 또한 pore 밀도에 따라 광학적 특성이 달라지는데 용이한 BBB 세포배양의 관찰과 형광 나노입자의 이미징을 위해서는 투명한 다공성 멤브레인을 보유한 트렌스웰을 선택하는 것이 선호된다.

트렌스웰은 사용하기에 매우 용이하며 세포간 화학적 상호작용을 모방하는데 적절하지만 뇌혈관 내피세포의 특성

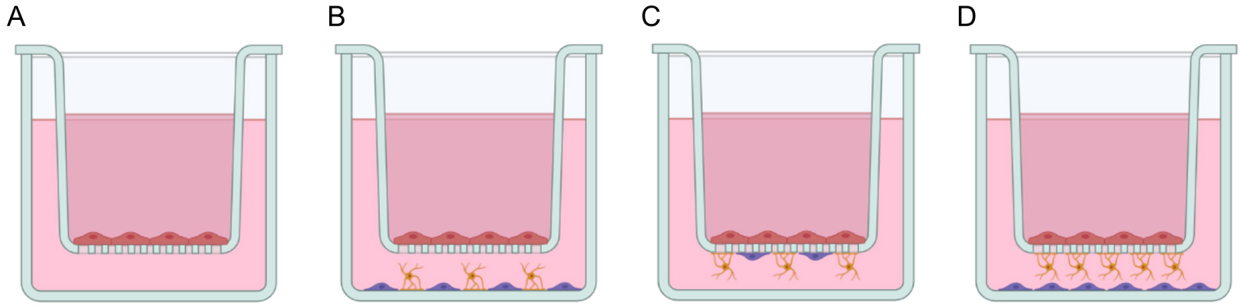

그림 1. 3차원 트렌스웰 기반 BBB 모델: (A) 뇌혈관 내피세포 단일배양, (B) 접촉 공배양(다공성막 상단부; 뇌혈관 내피세포, 다공성막 하단부; 성상교세포 및 혈관주위세포, (C) 비접촉 공배양(다공성막 상단부; 뇌혈관 내피세포, 하단챔버; 성상교세포 및 혈관주위세포), (D) 접촉 및 비접촉 공배양(다공성막 상단부; 뇌혈관 내피세포, 다공성막 하단부; 성상교세포, 하단챔버; 혈관주위세포).

발현에 필요한 shear stress를 모방하는 것이 불가능하다. 이로 인해 혈액의 유동에 의해 뇌혈관 내피세포에 가해지는 전단응력을 모사한 미세유체칩 기반 오간온어칩 모델이 새로운 대안으로 제시되고 있다.

2.4 오간온어칩 모델

뇌혈관 내피세포는 혈액의 유동에 의해 지속적으로 평균 6 dyn/cm^2 수준의 전단응력을 받고 있다.[10] 흥미롭게도 뇌혈관 내피세포는 일반 혈관 내피세포처럼 유동 흐름 방향에 따라 세포가 길어지지 않고 유동 흐름 방향의 90도로 세포가 틀어진다.[11] 이는 폐쇄연접의 길이를 최대한 줄여 연접 형성에 필요한 에너지를 줄이고 세포 사이 물질 이동을 최소화하려는 전략일 것이다. 일반적으로 이러한 전단응력이 BBB의 efflux pump, 수용체 발현 수준을 증가시켜 물질의 이동을 엄격하게 조절하게 하며 폐쇄 연접도 잘 발달하도록 함을 보여주는 여러 연구결과가 있다.

오간온어칩(organ-on-a-chip)기술은 반도체 미세공정 기술을 기반으로 나노-마이크로미터 수준의 구조물을 인공적으로 제작하고 각 장기의 미세환경에서 요구되는 물리적, 화학적, 생물학적 자극을 가함으로써 장기를 이루는 세포의 기능을 최대로 발현하게 하는 기술이다.[10] 특히 미세유체소자는 미세채널의 크기, 흘려보내는 배지의 유속, 배지의 점성 등을 정확히 조절함으로써 BBB 모델에서 요구되는 전단응력을 모사하기에 적합하다. 아직 오간온어칩 모델은 확장단계에 있어 고분자 약물전달 시스템 연구에 있어 널리 쓰이지 못하였지만 기존의 트렌스웰 모델에 비해 향상된 기능성을 보이기에 소개하고자 한다.

최근에 발표된 몇 가지 인체 BBB 모사 오간온어칩 모델을 살펴보자면 크게 1) 튜브모양의 세포외기질 하이드로젤을 지지체 초기부터 혈관구조 구축 2) 세포외기질 하이드로젤을 지지체로 뇌혈관 내피세포의 혈관생성(angiogenesis)을 유도 3) 하이드로젤 지지체 없이 마이크로 채널에 혈관 내피세포를 배양한 모델로 나눌 수 있다(그림 2).

첫 번째 모델의 예로서 Organoplate(Mimetas 사)를 이용한 고속분석 시스템화된 BBB 모델을 들 수 있다(그림 2A). Organoplate 미세채널 내에 존재하는 phase guide로 인해 점성이 높은 하이드로젤로 구획화된 채널이 형성될 수 있다.[12] 이를 이용하여 세포외기질 하이드로젤 내에 성상교세포와 microglia(소교세포)를 섞어 구획화된 하이드로젤 채널을 구축하고 나머지 채널 부분에 뇌혈관 내피세포를 배양하여 튜브모양의 뇌혈관을 형성할 수 있었다.[12] 두 번째 모델의 예로서 Lee 등이 2020년에 발표한 연구에 따르면 primary 뇌혈관 내피세포와 혈관주위세포를 구획화된 하이드로젤에 접촉 배양되도록 하고, 방향성이 있는 혈관유도를 위해 다른 채널에 VEGF를 분비하는 폐 섬유아세포를 배양하였다(그림 2B). 혈관생성이 유도되는 하이드로젤 채널에 성상교세포가 배양되어있기 때문에 뇌혈관 내피세포의 모세혈관 생성뿐만 아니라 성상교세포와 혈관주위세포로 인한 기능 발현도 확인할 수 있었다.[13] 세 번째 모델의 예로 Park 등이 발표한 BBB 오간온어칩을 들 수 있다(그림 2C).[14] 수직상으로 존재하는 두 마이크로채널을 PET 소재의 다공성막으로 분리한 형태로 다공성막 하단부에 iPSC로부터 배양한 뇌혈관 내피세포를 배양하고 상단부에 성상교세포와 혈관주위세포를 공배양 하였다. 특히 BBB 발달과정의 산소분압을 모방하여 뇌혈관 내피세포의 장벽 기능이 일주일 이상 유지되도록 하였으며 생체수준의 전단응력을 가함으로써(6 dyn/cm^2) BBB에서 구현하기 어려운 대사적 장벽의 기능을 구현하였다.[14] 또한, BBB 셔틀 펩타이드로 수식된 나노입자의 선택적 BBB 투과성을 연구할 수 있음을 제안하였다.[14]

앞서 설명한 오간온어칩 모델이 기존 static BBB 모델에 비해 생체 수준 장벽 기능 모사가 용이하나 투과 나노입자의 연구 플랫폼으로서 발전되기 위해서는 분석의 정확성과 편의성이 요구된다. 예를 들어 하이드로젤을 지지체로 형성된 BBB의 경우 전달된 나노입자의 투과성을 분석하기 위해서는 필연적으로 하이드로젤 내에 존재하는 나노입자를 이미징 방법으로 분석하거나 BBB 구조체를 무너뜨려 나노입자를 분리할 수밖에 없다. 이러한 방법이 불가능하거나 용이하지 않는 경우에는 세 번째 유형의 BBB 오간온어칩 모

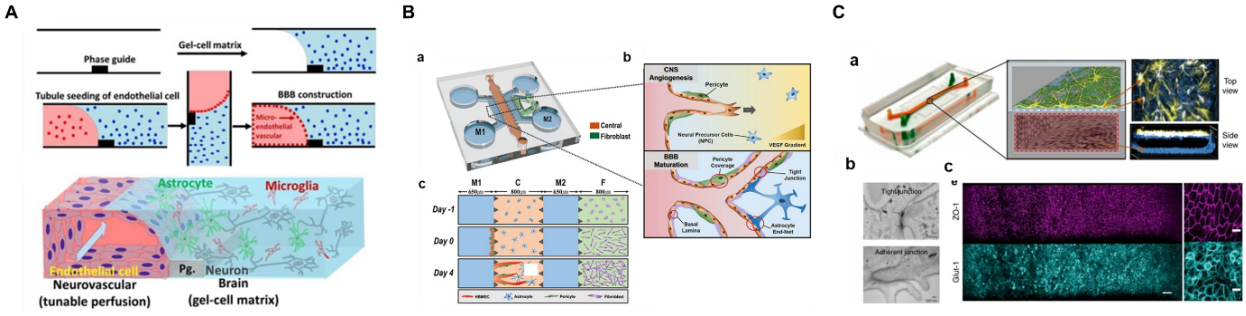

그림 2. BBB 오간온어칩 모델: (A) ECM 하이드로젤을 지지체로 한 BBB 모델,[12] (B) 뇌혈관 내피세포의 혈관생성유도를 통한 BBB 모델,[13] (C) 다공성 막으로 분리된 두 마이크로채널에 구축된 BBB 모델.[14]

델이 선호될 것이다. 이 경우 뇌혈관이 배양된 미세체널에 나노입자를 처리하고 반대편 채널의 배양액을 샘플링하여 BBB를 통과한 나노입자를 이미징만이 아닌 다양한 방법으로 정량 분석이 가능하기 때문이다.

3. 결론

지금까지 뇌 내 약물전달을 위한 고분자 입자의 BBB 투과 연구를 위한 다양한 인체 BBB 모델에 대해 소개하였다. 동물모델의 BBB는 인체 BBB와 기능적인 차이가 있으므로 반드시 세포기반의 인체 BBB 플랫폼을 이용한 연구가 필요하다. 그러나 소개한 트렌스웰 BBB 모델과 오간온어칩 BBB 모델에도 한계가 있다. 그 중 가장 큰 문제는 타 장기와의 상호작용에 대해 알 수 없는 것이다. 예를 들어 표적성을 지니도록 디자인된 고분자 나노입자의 BBB 투과성을 BBB 모델을 이용해 분석할 수 있지만 투과성을 다른 장기(예: 간, 폐 및 신장)와 상대적으로 분석하는게 불가능하며, 타 장기에 미칠 수 있는 부작용을 알 수가 없다. 최근에는 오간온어칩의 확장개념으로 다양한 생체칩을 연동한 바디온어칩(body-on-a-chip)이 개발되고 있어 뇌 내 약물 전달연구에 있어 활용도가 무궁무진할 것으로 예상된다.

참고문헌

1. J. Schiweck, B. J. Eickholt, and K. Murk, *Front. Cell. Neurosci.*, **12**, 261 (2018).
2. Y. Uchida, S. Ohtsuki, Y. Katsukura, C. Ikeda, T. Suzuki, J. Kamiie, and T. Terasaki, *J. Neurochem.*, **117**, 333 (2011).
3. T. Ohe, M. Sato, S. Tanaka, N. Fujino, M. Hata, Y. Shibata, A. Kanatani, T. Fukami, M. Yamazaki, and M. Chiba, *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 1251 (2003).
4. S. Baltes, A. M. Gastens, M. Fedrowitz, H. Potschka, V. Kaever, and W. Löscher, *Neuropharmacology.*, **52**, 333 (2007).
5. B. Weksler, I. A. Romero, and P. O. Couraud, *Fluids Barriers CNS*, **10**, 16 (2013).
6. E. S. Lippmann, A. Al-Ahmad, S. M. Azarin, S. P. Palecek, and E. V. Shusta, *Sci. Rep.*, **4**, 4160 (2014).
7. D. J. Mc Carthy, M. Malhotra, A. M. O'Mahony, J. F. Cryan, and C. M. O'Driscoll, *Pharm. Res.*, **32**, 1161 (2015).
8. L. P. Wu, D. Ahmadvand, J. Su, A. Hall, X. Tan, Z. S. Farhangrazi, and S. M. Moghimi, *Nat. Commun.*, **10**, 4635 (2019).
9. E. Vandenhaute, A. Drolez, E. Sevin, F. Gosselet, C. Mysiorek, and M.-P. Dehouck, *Lab. Invest.*, **96**, 588 (2016).
10. L. Cucullo, M. Hossain, V. Puvenna, N. Marchi, and D. Janigro, *BMC Neurosci.*, **12**, 40 (2011).
11. M. Ye, H. M. Sanchez, M. Hultz, Z. Yang, M. Bogorad, A. D. Wong, and P. C. Searson, *Sci. Rep.*, **4**, 4681 (2014).
12. Y. Koo, B. T. Hawkins, and Y. Yun, *Sci. Rep.*, **8**, 2841 (2018).
13. S. Lee, M. Chung, S. R. Lee, and N. L. Jeon, *Biotechnol. Bioeng.*, **117**, 748 (2020).
14. T. E. Park, N. Mustafaoglu, A. Herland, R. Hasselkus, R. Mannix, E. A. FitzGerald, R. Prantil-Baun, A. Watters, O. Henry, M. Benz, H. Sanchez, H. J. McCrea, L. C. Goumnerova, H. W. Song, S. P. Palecek, E. Shusta, and D. E. Ingber, *Nat. Commun.*, **10**, 2621 (2019).