

血-视网膜内屏障体外模型构建研究进展

袁晨^{1,2}, 张梅³, 谢学军⁴

引用:袁晨,张梅,谢学军. 血-视网膜内屏障体外模型构建研究进展. 国际眼科杂志 2021;21(6):991-995

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 81473735)

作者单位:¹(473004)中国河南省南阳市,南阳理工学院张仲景国医国药学院;²(610072)中国四川省成都市,成都中医药大学眼科学院;³(610075)中国四川省成都市,成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地;⁴(610072)中国四川省成都市,成都中医药大学附属医院眼科

作者简介:袁晨,毕业于成都中医药大学,博士,医师,研究方向:中医药防治眼病及视功能保护的研究。

通讯作者:谢学军,博士,博士研究生导师,主任医师,教授,研究方向:中西医结合诊治眼科疾病. xxj8848@163.com

收稿日期:2020-07-15 修回日期:2021-04-27

摘要

血-视网膜内屏障是维持视网膜内环境稳态的重要结构基础,其完整的结构和功能仍缺乏更为深入的研究。体外血-视网膜内屏障模型具有可控、高效、快速、稳定等特点,已成为研究屏障具体构成和功能的一种有效工具。本文主要对血-视网膜内屏障的结构组成、功能以及体外模型的构建进行综述,有助于推进血-视网膜内屏障生理生化、病理药理及临床等方面的研究,并为糖尿病视网膜病变等眼底血管性疾病的研究提供一种共性与关键的实验基础。

关键词:血-视网膜内屏障;体外模型;研究进展

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.6.10

Progress in the construction of inner blood retinal barrier model *in vitro*

Chen Yuan^{1,2}, Mei Zhang³, Xue-Jun Xie⁴

Foundation item: General Program of National Natural Science Foundation of China (No.81473735)

¹Zhang Zhongjing College of Chinese Medicine, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, Henan Province, China; ²College of Ophthalmology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, Sichuan Province, China; ³College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicines of Ministry of Education; State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 610075, Sichuan Province, China;

⁴Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

Correspondence to: Xue-Jun Xie. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, Sichuan Province, China. xxj8848@163.com

Received:2020-07-15 Accepted:2021-04-27

Abstract

• The blood-retinal barrier is an important structural basis for maintaining the homeostasis of the retinal environment, but there is still a lack of further research on its complete structure and function. The *in vitro* blood-retinal barrier model has the characteristics of controllable, efficient, fast and stable, and has become an effective tool to study the specific structure and function of the barrier. This paper mainly reviews the structure, function and *in vitro* model of blood-retinal barrier, which is helpful to promote the study of physiology, biochemistry, pathopharmacology and clinic of blood-retinal barrier. It also provides a common and key experimental basis for the study of fundus vascular diseases such as diabetic retinopathy.

• KEYWORDS: inner blood-retinal barrier; model *in vitro*; research progress

Citation: Yuan C, Zhang M, Xie XJ. Progress in the construction of inner blood retinal barrier model *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(6):991-995

0 引言

血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)是视网膜重要的生理结构,能够调节眼血管床和视网膜组织间液体和分子运动,防止大分子和其它有害物质渗入视网膜,在维持正常血管功能的生理屏障、保持视网膜和视网膜神经微环境方面具有重要的作用^[1]。BRB包括内层视网膜屏障和外层视网膜屏障两部分。由于血-视网膜内屏障(inner BRB, iBRB)功能的损害是引起糖尿病视网膜病变等视网膜血管性疾病发生的主要原因,因此该领域研究正愈加被关注。阐明 iBRB 的结构组成及功能并建立一个理想的体外模型对推进生理生化、病理药理及临床等方面的研究具有较大的理论与临床意义。

1 血-视网膜内屏障的结构组成

iBRB是由单层紧密附着的视网膜微血管内皮细胞(retinal microvascular endothelial cell, RMEC)、周细胞(pericytes cell, PC)、星形胶质细胞(astrocytes cell, AC)及基底膜共同构成的神经血管单位,它存在于视网膜神经层的血管与神经组织之间,是一个动态的调节结构^[2]。

1.1 视网膜微血管内皮细胞 视网膜微血管内皮细胞位于视网膜血管内壁,形态扁平,单层生长,具有复杂的紧密连接(tight junctions, TJs),提示 RMEC 是屏障内皮细胞,

能严格筛选药物及外源性物质的通透;RMEC 具有丰富的线粒体,能为细胞主动转运物质提供高能量,所以 RMEC 对维持血管的正常通透和物质的正常转运起到了关键性作用。RMEC 是构成 iBRB 和维持其功能完整性至关重要的结构,与其直接接触的星形胶质细胞和周细胞共同保持着 iBRB 的完整及致密性。RMEC 不仅能够确保视网膜的营养及氧气的供应,还有助于 iBRB 将循环产生的毒素分子、炎症免疫细胞等排出体外,以达到保护视网膜的作用^[3]。所以,RMEC 在保证正常的 iBRB、正常的微血管功能方面发挥着十分重要的作用。

1.2 周细胞 PC 是广泛分布于全身毛细血管壁的结构细胞,典型的成熟组织内周细胞位于微血管内皮细胞的外侧壁,两者间存在着紧密连接、缝隙连接、针-槽复合体和黏着斑等多种连接方式,并由共同的基底膜包裹,维持了血管壁的完整性^[4-6]。PC 不仅提供机械支持,而且与内皮细胞一起构成微血管和组织间隙的屏障,并通过物理接触与旁分泌信号与内皮细胞进行相互作用,调节血-视网膜屏障的通透性、视网膜血流以及应激反应,是维持内环境稳定的重要因素^[7-9]。视网膜具有很高的 PC 密度,PC 与内皮细胞的比例约为 1:1,PC 在不同组织器官分布密度的差异与其调控毛细血管屏障、内皮增殖及维持毛细血管张力及直径等生理作用是一致的^[10-11]。普遍认为,PC 数量越多,被覆盖率越高,微血管的屏障功能就越好^[12-13]。有学者发现,同血-脑屏障的发育相似,PC 可能通过为视网膜内皮细胞形成屏障特性提供合适的微环境而参与 iBRB 的早期形成。虽然 iBRB 的紧密性主要是由内皮细胞之间紧密而黏附的连接介导的,但 PC 已被证明是 iBRB 的重要组成部分^[14]。

1.3 星形胶质细胞 RMEC 被 PC 覆盖,而 PC 又由 AC 支持^[15]。视网膜中的 AC 包括原浆型星形胶质细胞、纤维型星形胶质细胞,还有脊椎动物视网膜中特有的视网膜 Müller 胶质细胞^[16] (retinal Müller glial cell, RMGC),RMGC 仅在视网膜中发现,并且是唯一的几乎覆盖整个视网膜厚度的视网膜细胞。AC 的突起发出分支,借助血管足附着于血管壁上,形成毛细血管的外围界膜,不仅维持了视网膜毛细血管的完整性^[17],而且在内皮细胞由非屏障细胞向屏障细胞转变的诱导、维持和增强屏障特性等方面发挥着重要的作用^[18-20]。同时,AC 还具有很强的分泌作用,通过分泌各种因子(如转化生长因子- β 、胶质细胞源性神经营养因子、碱性成纤维细胞生长因子和血管生成素-1 等),调节 iBRB 的屏障作用,并调节血管张力和血流量^[21-23]。所以说,AC 在维持 iBRB 结构和特性方面均起着关键作用。

1.4 基底膜 基底膜是 iBRB 的重要组成部分,它是位于 RMEC 和 PC 之外的一层无定形的连续性膜结构,两者通过共享的基底膜连接进行交流,起到调节和限制物质交换的作用,是血液和组织间的一道屏障^[24]。基底膜由 3 个并列蛋白组成,它们分别为结构蛋白(胶原蛋白和弹性蛋白)、特殊蛋白质(纤连蛋白和层黏连蛋白)和蛋白聚糖^[25],这些蛋白又由不同的细胞外基质分子组成。除了内皮细胞自身可合成部分基底膜成分以外,PC 和 AC 也是这些细胞外基质的重要来源,它们共同参与形成并维持视网膜毛细血管的基底膜^[26]。基底膜的破坏势必影响 iBRB 的屏障功能。

1.5 紧密连接 研究发现,屏障功能最重要的部件是

TJs^[27]。TJs 是功能性的细胞间结构,它们封闭细胞间隙,在相邻细胞之间形成屏障,通过不断地密封和解封,以调节液体、离子和小分子等的运输,控制内皮细胞的细胞旁通透性^[28]。除了对细胞旁通道的屏障功能外,TJs 还具有另一种屏障功能,阻碍顶端和基底外侧膜蛋白和脂质的扩散,从而参与细胞极性^[29]。TJs 是由含有跨膜蛋白(封闭蛋白 Claudin、闭锁蛋白 Occludin 和连接黏附分子 JAM)和外周胞质蛋白(如带状闭合蛋白 zonula occludens 1-3、ZO1-3)的多蛋白复合物形成的独特组合^[30]。屏障功能的改变与 TJs 蛋白的蛋白表达、磷酸化、泛素化和亚细胞分布的改变有关^[31]。现已有大量研究证明,TJs 是 iBRB 的结构及功能的重要基础,视网膜病变能够导致 TJs 的改变,从而对 iBRB 造成破坏^[32-35]。

2 血-视网膜内屏障的功能

iBRB 通过视网膜内皮细胞间的紧密连接及周细胞、星形胶质细胞等其它细胞的参与形成了结构屏障,这种“屏障”起到了视网膜和血液循环之间选择性分隔的作用,并维持了高度专业化的神经紧密连接环境。应该强调的是,BRB 并不是分子从循环到视网膜交换的绝对障碍。相反,它提供了一种选择性机制,允许和促进营养物质进入视网膜,并且排除和阻止潜在危险性物质通过,以便视网膜可以顺利调节其内环境,以应对不同的新陈代谢需求。iBRB 是一个动态变化的结构,可以通过多种途径和细胞间的相互作用来调控视网膜在生理、病理情况的功能,如对紧密连接蛋白^[36-37]、转运载体^[38-39]及酶类^[40-41]的调控。iBRB 功能的改变与许多病理过程联系紧密,若屏障功能遭到破坏,会引发甚至加剧许多视网膜血管性疾病的发生发展,如糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞、葡萄膜炎等。所以,iBRB 结构的完整和功能的维持是拥有正常视力所必需的。

3 血-视网膜内屏障体外模型的构建

建立体外 iBRB 模型是重要的研究手段,便于我们能对 iBRB 病理生理状态进行更加深入的研究。只有使用比较理想的体外模型,所得出的结论才能更接近体内实际情况,预测才更具有实际意义。一个理想的体外 iBRB 模型不仅要有和体内一致的细胞形态和生理结构分布,还要具有尽可能多的 iBRB 的生理特征。现体外 iBRB 模型的建立在不断发展和完善。

3.1 RMEC 模型

3.1.1 单视网膜微血管内皮细胞模型 RMEC 是 iBRB 的核心成员,单独培养的 RMEC 能够较好地保持在体特征,基本可以模拟 iBRB 功能,这是最简单可行也是最常见的用于研究 iBRB 通透性的体外模型。目前使用的 RMEC 来源各异,国内外已可以将人、鼠、猪、兔、山羊、恒河猴和牛的视网膜内皮细胞进行体外培养实验,其中对于 iBRB 的研究常采用人、鼠和牛来建立体外模型,通常采用机械的方法或者某些消化酶来分离视网膜微血管,并通过添加不同生长因子、磁珠标记法、物理刮除法等密度沉降分离法来得到纯度较高的内皮细胞。体外 RMEC 单层模型大多是在静态系统培养条件下,将 RMEC 直接接种于培养皿或跨膜小室(Transwell)上培养,待细胞成功融合会呈现单层铺路石样排列,并出现接触抑制,可通过 PECAM-1、CD31、 $\text{V}\alpha$ 因子等特异性标记物进行鉴定,通过测量跨内皮细胞电阻值(TEER)、HRP 通透性等方法进行生理特性的鉴定^[42-43]。

3.1.2 二元培养模型 iBRB 上的各种细胞均有自身独特的空间定位,这是细胞之间进行相互作用以及维持屏障功能的基础。研究认为随着时间的推移,单独培养的 RMEC 会逐渐丧失 iBRB 在体内的许多特性,有学者选择将 RMEC 与组成 iBRB 的其它细胞进行共同培养,发现 RMEC 加入其它细胞后能更好模拟体内微环境状态,具有更好的屏障特性。Tretiach 等^[44]测量了在小孔径(0.4 μ m)和大孔径(3 μ m)聚碳酸酯 Transwell 过滤器上的牛视网膜毛细血管内皮细胞单独培养的电阻,并将其与内皮细胞和 Müller 细胞的共培养进行了比较,然后将每组中电阻最高和最低的制剂固定在培养 8~9d 后进行电子显微镜检查,发现在 0.4 μ m 滤膜上,尽管共培养的内皮细胞和 Müller 细胞在滤膜两侧之间没有直接接触,但共培养组的 TEER 显著高于内皮细胞单独培养,表明在内皮细胞附近的 Müller 细胞对屏障功能有积极的影响,而不仅仅是内皮细胞和 Müller 细胞的相加作用。之后 Tretiach 等^[45]又通过对 TEER 和菊粉通量测量,发现在常氧条件下,RMEC 与 RMGC 共培养组较 RCEC 单层具有更佳的屏障功能。郭斌^[46]将 RMEC 与 RMGC 在微孔膜上共培养建立了体外大鼠 iBRB 模型,发现 RMGC 可以促进 RMEC 之间的 TJs 形成,提高屏障功能。通过多位学者的研究,得出了 RMEC 与 RMGC 共培养模型制备的方法一般是将 RMEC 与 RMGC 分别接种于 0.4 μ m 孔径微孔膜的 Transwell 小室的内、外底面,共培养后两种细胞均能贴壁生长,由于微孔膜的存在,细胞之间可以进行相互作用但并未直接接触,示踪剂通透性试验和 TEER 可证实内皮屏障的形成。

周细胞在 iBRB 中同样具有重要的作用,近年来,有学者将 RMEC 与周细胞进行共培养用于研究两种细胞之间的联系、可溶性分子的交换或仿生组织微环境内的相互作用。Diana 等介绍了三种人视网膜微血管内皮细胞 (HREC) 与牛视网膜周细胞 (BRP) 共培养的方式,其中包括了二维 (2D) 直接和间接共培养方法^[47]。直接培养的方式是将 HREC 与 BRP 按 1:1 的比例在培养板中共培养,间接培养是将周细胞接种在 6 孔或 24 孔板上过夜,第 2d 将内皮细胞以 1:1 的比例接种在相应的 Transwell 上腔中继续培养,从而将两种细胞进行共培养。

3.1.3 三元培养模型 Nakagawa 等^[48]采用大鼠脑微血管内皮细胞、星形胶质细胞和周细胞,发现不同共培养模型的 TEER 值明显不同:三元共培养>周细胞二元共培养>胶质细胞二元共培养>脑微血管内皮细胞单独培养,由于 iBRB 与血-脑屏障 (BBB) 高度的相似性,学者们在此基础上建立了 iBRB 的三元培养模型。Wilkerson 等^[49]将原代 HREC、视网膜周细胞和 Müller 细胞分别以 3:1:1 的比例在载玻片中建立 iBRB 的 Tricell 培养模型。更多的三元培养模型是将 3 种细胞同时接种在 Transwell 培养池中,RMEC 被接种在微孔膜上方,周细胞在膜下方贴膜接种,星形胶质细胞在培养池底部贴壁接种,同样可以使用荧光示踪剂及 TEER 测量等方法对屏障完整性进行评定^[15,50]。

3.2 永生化细胞模型 自从 Greenwood 等^[51]提出了“由大鼠 BBB 和 BRB 衍生的永生细胞系是研究特殊细胞屏障有用工具”的观点后,以 Hosoya 等^[52-53]为代表的一些学者进行了更为深入的研究,他们成功建立的条件永生的视网膜毛细血管内皮细胞系 (TR-iBRB),具有视网膜毛细血管内皮细胞的特性。这种由 Tg 大鼠建立的屏障细胞系具有体内转运功能,不仅是药物转运至视网膜的良好体外模

型,并且是筛选可能传递至视网膜的药物的良好模型^[54]。Shen 等^[55]将 TR-iBRB 细胞接种在可渗透膜滤膜上生长,通过测定一些药物化合物成分在跨培养细胞层的转运,以确定表观渗透系数 (Papp),发现此模型为预测整个 BRB 的渗透性提供了有用的工具,但该模型对眼后部候选药物的高通量筛选和排序在治疗眼病方面的有效性需要通过与活体数据的相关性进行进一步的论证。2000 年, Hosoya 从 Tg 大鼠中获得了九种永生化的大鼠视网膜毛细血管内皮细胞系 (TR-iBRBs),并将其命名为 TR-iBRB1-9,到目前为止 TR-iBRB2 应用最为广泛。Kubo 等^[56]根据初始吸收率 (V) 和 Papp,研究了 BRB 渗透率与膜渗透率之间的关系,其中对 TR-iBRB2 细胞的摄取研究表明,它在基于体外分析的被动扩散和载体介导的药物转运的系统 BRB 通透性评估中具有很好的应用前景。TR-iBRBs 取材于具有温度敏感的 SV40 大 T 抗原基因的转基因大鼠 (Tg 大鼠) 中,温度维持在 33 $^{\circ}$ C 时,TR-iBRBs 细胞将永生并迅速生长。这种细胞能够表现出内皮特征性的纺锤状纤维状形态,同时还表达 vonWillebrand 因子作为内皮细胞标志物,并且是乙酰化低密度脂蛋白 (Ac-LDL) 的清除剂受体。

3.3 通过 3D 细胞外基质建立 iBRB 体外模型 迄今为止,大多数基于细胞的测定法都使用传统的二维培养方法,即将细胞培养在平面环境中,但在体内,细胞则被其他细胞、组织和细胞外基质 (ECM) 重重包围。尽管历史悠久的 2D 细胞培养已被证明是用于细胞研究的一种有价值的方法,但 2D 细胞培养无法充分考虑细胞的自然 3D 环境,其局限性已得到越来越多的认识。于是,研究人员开始尝试 3D 细胞培养,并观察它与 2D 培养的差异。而最近几年出现了三维水凝胶、ECM 和固体支架所建立的 3D 培养模型^[57-58],已经有越来越多的证据表明 3D 细胞培养与 2D 培养系统相比可以更准确地表示细胞在组织中驻留的实际微环境。Diana 等将猪小肠做成 ECM 支架,先在支架上接种 5×10^4 个 HREC,孵育 2h 后,加入等量的 BRP,使两种细胞共培养以研究它们在 3D 仿生环境中的相互作用^[47]。Beharry 等^[17]分别将 HREC 和人视网膜星形胶质细胞 (HRA) 在 Transwell (2D) 及 AlgiMatrix、Geltrex 基质等 2 种可生物降解的 3D 水凝胶支架上共培养,其中 AlgiMatrix 是一种非动物来源的海绵,由冷冻干燥的海藻酸凝胶制成。接种细胞前,将细胞重悬,并加入 10% (v/v) 的 AlgiMatrix 固化缓冲液。用细胞悬液接种在海绵上。5min 后,再向海绵中加入不含固化缓冲液的培养基,进行孵育。对于 HREC 和 HRA 的共培养,首先接种 HRA,48h 后,将海绵翻转用于接种 HREC; Geltrex 基质是一种基底膜提取物,含有 IV 型胶原、层黏连蛋白和其他基质蛋白和生长因子,在 15 $^{\circ}$ C 以上 5~10min 内形成凝胶先将 Geltrex 基底膜在 4 $^{\circ}$ C 下解冻过夜。第 2d,培养皿表面被 Geltrex 基质,置于培养箱 30min 后先接种 HRA,48h 后在 HRA 上直接接种 HREC,使两种细胞共培养。将实验进行比较后,他们发现 HRA 增强和促进间歇性缺氧状态下 HREC 的反应,并且在 3D 支架上培养的细胞表现出较少的氧化应激反应,所以认为在 3D 支架上共培养的 HREC 和 HRA 可能概括了动态 iBRB 的药物反应,在临床眼科药物的发现和开发上有很好的应用前景。

4 总结和展望

由于体内实验耗时耗力,且存在动物种属差异、伦理

限制等多种复杂因素的干扰,而体外模型更加可控、经济,故体外模型的建立具有十分重要的意义。选取适合的体外培养模型是实验的关键,这就需要根据研究目的并结合各种模型的优缺点进行选择。

单层 RMEC 模型能够较好地保持在体特性,其显著优点是易操控并可表达多种重要的转运蛋白,可应用于研究信号通路、转运动力学、药物的高通量筛选以及结合亲和力的测量。因 RMEC 培养技术已比较成熟,应用较广泛,故它是药理学研究中最常用的体外培养模型之一。但原代培养的 RMEC 需多次重复传代纯化才能获得足够数量的实验细胞,且这种模型结构单一,其忽略了其它细胞群之间的信号传导和机械性刺激的致敏性调节,且不易形成单层 TJs,很大程度限制了长期维持 iBRB 模型特性的能力。同时模型 TEER 较低,渗透性较高,与体内实际情况差距较大。

据以往研究可知,周细胞和胶质细胞均在调节 RMEC 紧密连接及维持 iBRB 结构和功能方面起着重要的作用。这种将细胞共培养的多元培养形式所反映的细胞间的移动以及动态的相互作用与体内更加相似,能够增加 iBRB 的紧密连接,更加充分地模拟在体微环境,体现内皮细胞的屏障作用,同时在展示结构复杂性的研究中更具有代表性。多细胞共培养模型可通过对各种细胞之间及细胞与内环境之间的相互作用进行研究,也可进一步探究药物对细胞的作用和疾病的损伤机制。但由于各种细胞的培养较复杂,成本较高,共培养操作步骤较为繁琐,在模型的广泛应用方面具有一定的局限性。并且这些模型培养的细胞往往缺乏极性,故只具有部分屏障功能,只适合于进一步的物质通透性研究。

永生细胞是已知增殖效果好,能保留亲本重要形态、特性及功能的细胞,而且可以避免原代细胞提取过程的繁琐步骤,也排除了其他细胞的污染,有利于细胞的纯化。模型的来源稳定,制备成本较低,效率高。但是此种模型分化程度较低,并不能完全体现 iBRB 的特点。而且模型渗透性较高,TEER 值小,不宜进行通透性筛选试验,多通过细胞摄取试验研究生理或病理条件下 iBRB 的转运机制^[59]。

通过 3D 细胞外基质建立的 iBRB 体外模型比 2D 培养系统更具有生理学意义,可较好地表现出细胞和细胞外基质的相互作用,并且能更好地模拟细胞在组织中生长及作用的实际微环境,能更加准确地反映出体内细胞的各种反应。细胞在三维支架上的共培养模型可以作为临床前药物发现和开发的强大仿生模型,可以应用于新药开发及筛选的最初几个阶段用于靶点识别,药物剂量优化,以及在后期 II/III 期试验中减少药物毒性和治疗失败等多方面^[60]。水凝胶基质,是一种水溶性聚合物,由于其高含水量,与玻璃体液体相似,因此非常适合眼科应用。而且它们另外一个优点是可以保护药物,延长平均停留时间,并能持续给药。但这种 3D 微环境也存在着许多缺陷。例如缺乏剪切应力或细胞培养时,氧气、营养以及可溶性的生长因子的分布在整个培养层中可能会是不均匀的,而且凝胶也会随着介质的扩散出现梯度^[61]。

随着对 iBRB 生理、病理的研究逐渐深入,在体外建立 iBRB 模型的研究也从简单的单细胞培养逐步发展到多元共培养、永生细胞系及 3D 细胞外基质等方法,iBRB 模型的模拟程度越来越高,具有更多的功能性,并且

更贴近体内微环境。但目前所有的体外 iBRB 模型各有其优缺点,使得体外 iBRB 模型的研究需不断完善,以便为人们在科研道路上取得更多进展提供更好的基础。

参考文献

- 1 Liu L, Liu XD. Roles of drug transporters in blood-retinal barrier. *Adv Exp Med Biol* 2019;1141:467-504
- 2 Klaassen I, van Noorden CJ, Schlingemann RO. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Prog Retin Eye Res* 2013;34:19-48
- 3 刘子睿, 张丽琼, 高丽园, 等. 视网膜微血管内皮细胞在糖尿病视网膜病变中的研究现状. *现代生物医学进展* 2014;13:2590-2592
- 4 Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005;97(6):512-523
- 5 Stofkova A, Murakami M. Neural activity regulates autoimmune diseases through the gateway reflex. *Bioelectron Med* 2019;5:14
- 6 Park DY, Lee J, Kim J, et al. Plastic roles of pericytes in the blood-retinal barrier. *Nat Commun* 2017;8:15296
- 7 Hayes KL. Pericytes in type 2 diabetes. *Adv Exp Med Biol* 2019;1147:265-278
- 8 Shiraya T, Araki F, Ueta T, et al. Ursodeoxycholic acid attenuates the retinal vascular abnormalities in anti-PDGFR- β antibody-induced pericyte depletion mouse models. *Sci Rep* 2020;10(1):977
- 9 Choi SH, Chung M, Park SW, et al. Relationship between pericytes and endothelial cells in retinal neovascularization: a histological and immunofluorescent study of retinal angiogenesis. *Korean J Ophthalmol* 2018;32(1):70-76
- 10 Caporarello N, D'Angeli F, Cambria MT, et al. Pericytes in microvessels: from "mural" function to brain and Retina regeneration. *Int J Mol Sci* 2019;20(24):E6351
- 11 李磊, 刘建勋, 郭浩, 等. 周细胞与微血管疾病及中医药研究进展. *中国中药杂志* 2017;42(16):3072-3077
- 12 Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* 2011;21(2):193-215
- 13 van der Wijk AE, Vogels IMC, van Veen HA, et al. Spatial and temporal recruitment of the neurovascular unit during development of the mouse blood-retinal barrier. *Tissue Cell* 2018;52:42-50
- 14 Trost A, Bruckner D, Rivera FJ, et al. Pericytes in the Retina. *Adv Exp Med Biol* 2019;1122:1-26
- 15 Fresta CG, Fidilio A, Caruso G, et al. A new human blood-retinal barrier model based on endothelial cells, pericytes, and astrocytes. *Int J Mol Sci* 2020;21(5):1636
- 16 de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, et al. Retinal macroglial responses in health and disease. *Biomed Res Int* 2016;2016:2954721
- 17 Beharry KD, Cai CL, Valencia GB, et al. Human retinal endothelial cells and astrocytes cultured on 3-D scaffolds for ocular drug discovery and development. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2018;134:93-107
- 18 Nicchia GP, Pisani F, Simone L, et al. Glio-vascular modifications caused by Aquaporin-4 deletion in the mouse Retina. *Exp Eye Res* 2016;146:259-268
- 19 Hosoya K, Tachikawa M. The inner blood-retinal barrier: molecular structure and transport biology. *Adv Exp Med Biol* 2012;763:85-104
- 20 Tout S, Chan-Ling T, Holländer H, et al. The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience* 1993;55(1):291-301
- 21 Shin ES, Huang Q, Gurel Z, et al. High glucose alters retinal astrocytes phenotype through increased production of inflammatory cytokines and oxidative stress. *PLoS One* 2014;9(7):e103148
- 22 Verkhatsky A, Parpura V, Pekna M, et al. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans* 2014;42(5):1291-1301
- 23 Zhu LX, Zang JK, Liu B, et al. Oxidative stress-induced RAC

- autophagy can improve the HUVEC functions by releasing exosomes. *J Cell Physiol* 2020;235(10):7392-7409
- 24 何宇, 谢学军. 星形胶质细胞与血-视网膜屏障. *中国中医眼科杂志* 2005;15(2):114-116
- 25 孟凡荣. 体外血脑屏障模型的建立及纳米药物的中枢靶向效应研究. 军事科学院 2018
- 26 Abbott NJ, Rönnebeck L, Hansson E. Astrocyte - endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006;7(1):41-53
- 27 Tervonen A, Ihalainen TO, Nymark S, et al. Structural dynamics of tight junctions modulate the properties of the epithelial barrier. *PLoS One* 2019;14(4):e0214876
- 28 Shi JH, Barakat M, Chen DD, et al. Bicellular tight junctions and wound healing. *Int J Mol Sci* 2018;19(12):E3862
- 29 Cong X, Kong W. Endothelial tight junctions and their regulatory signaling pathways in vascular homeostasis and disease. *Cell Signal* 2020;66:109485
- 30 Angulo-Urarte A, van der Wal T, Huvencers S. Cell-cell junctions as sensors and transducers of mechanical forces. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2020;1862(9):183316
- 31 Molins B, Mora A, Romero-Vázquez S, et al. Shear stress modulates inner blood retinal barrier phenotype. *Exp Eye Res* 2019;187:107751
- 32 Hudson N, Campbell M. Inner blood-retinal barrier regulation in retinopathies. *Adv Exp Med Biol* 2019;1185:329-333
- 33 Ouyang H, Mei X, Zhang T, et al. Ursodeoxycholic acid ameliorates diabetic retinopathy via reducing retinal inflammation and reversing the breakdown of blood-retinal barrier. *Eur J Pharmacol* 2018;840:20-27
- 34 Kady NM, Liu X, Lydic TA, et al. ELOVL4-mediated production of very long-chain ceramides stabilizes tight junctions and prevents diabetes-induced retinal vascular permeability. *Diabetes* 2018;67(4):769-781
- 35 Iwamoto N, Higashi T, Furuse M. Localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts of brain and retinal endothelial cells *in vivo*. *Cell Struct Funct* 2014;39(1):1-8
- 36 van der Wijk AE, Canning P, van Heijningen RP, et al. Glucocorticoids exert differential effects on the endothelium in an *in vitro* model of the blood-retinal barrier. *Acta Ophthalmol* 2019;97(2):214-224
- 37 Li Y, Bai YJ, Jiang YR, et al. Apelin-13 is an early promoter of cytoskeleton and tight junction in diabetic macular edema via PI-3K/Akt and MAPK/erk signaling pathways. *Biomed Res Int* 2018;2018:3242574
- 38 Kubo Y, Akanuma SI, Hosoya KI. Impact of SLC6A Transporters in Physiological Taurine Transport at the Blood-Retinal Barrier and in the Liver. *Biol Pharmaceutical Bull* 2016;39(12):1903-1911
- 39 Usui T, Kubo Y, Akanuma S, et al. B-alanine and l-histidine transport across the inner blood-retinal barrier: potential involvement in L-carnosine supply. *Exper Eye Res* 2013;113:135-142
- 40 Monickaraj F, McGuire P, Das A. Cathepsin D plays a role in endothelial-pericyte interactions during alteration of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *FASEB J* 2018;32(5):2539-2548
- 41 Platania CBM, Lazzara F, Fidilio A, et al. Blood-retinal barrier protection against high glucose damage: The role of P2X7 receptor. *Biochem Pharmacol* 2019;168:249-258
- 42 李建桥, 江静波, 罗燕, 等. 体外培养人视网膜微血管内皮细胞屏障功能的研究. *中国病理生理杂志* 2009;25(4):749-754
- 43 Yaccino JA, Chang YS, Hollis TM, et al. Physiological transport properties of cultured retinal microvascular endothelial cell monolayers. *Curr Eye Res* 1997;16(8):761-768
- 44 Tretiach M, van Driel D, Gillies MC. Transendothelial electrical resistance of bovine retinal capillary endothelial cells is influenced by cell growth patterns: an ultrastructural study. *Clin Exp Ophthalmol* 2003;31(4):348-353
- 45 Tretiach M, Madigan MC, Wen L, et al. Effect of Müller cell co-culture on *in vitro* permeability of bovine retinal vascular endothelium in normoxic and hypoxic conditions. *Neurosci Lett* 2005;378(3):160-165
- 46 郭斌. 体外内层血视网膜屏障模型中紧密连接与细胞旁通透性变化研究. 第四军医大学 2006
- 47 Sánchez-Palencia DM, Bigger-Allen A, Saint-Geniez M, et al. Coculture Assays for Endothelial Cells-Mural Cells Interactions. *Methods Mol Biol* 2016;1464:35-47
- 48 Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, et al. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int* 2009;54(3-4):253-263
- 49 Wilkerson I, Laban J, Mitchell JM, et al. Retinal pericytes and Cytomegalovirus infectivity: implications for HCMV-induced retinopathy and congenital ocular disease. *J Neuroinflammation* 2015;12:2
- 50 Wisniewska-Kruk J, Hoeben KA, Vogels IM, et al. A novel co-culture model of the blood-retinal barrier based on primary retinal endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Exp Eye Res* 2012;96(1):181-190
- 51 Greenwood J, Pryce G, Devine L, et al. SV40 large T immortalised cell lines of the rat blood-brain and blood-retinal barriers retain their phenotypic and immunological characteristics. *J Neuroimmunol* 1996;71(1-2):51-63
- 52 Hosoyanner KI, Tomi M, Ohtsuki S, et al. Conditionally immortalized retinal capillary endothelial cell lines (TR-iBRB) expressing differentiated endothelial cell functions derived from a transgenic rat. *Exp Eye Res* 2001;72(2):163-172
- 53 Hosoya K, Tomi M. Advances in the Cell Biology of Transport via the Inner Blood-Retinal Barrier; Establishment of Cell Lines and Transport Functions. *Biol Pharm Bull* 2005;28(1):1-8
- 54 Terasaki T, Hosoya K. Conditionally immortalized cell lines as a new *in vitro* model for the study of barrier functions. *Biol Pharm Bull* 2001;24(2):111-118
- 55 Shen J, Cross ST, Tang-Liu DD, et al. Evaluation of an Immortalized Retinal Endothelial Cell Line as an *In Vitro* Model for Drug Transport Studies across the Blood-Retinal Barrier. *Pharm Res* 2003;20(9):1357-1363
- 56 Kubo Y, Fukui E, Akanuma S, et al. Application of membrane permeability evaluated in *in vitro* analyses to estimate blood-retinal barrier permeability. *J Pharm Sci* 2012;101(7):2596-2605
- 57 Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol* 2014;12(4):207-218
- 58 Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng* 2009;103(4):655-663
- 59 Vandenhoute E, Sevin E, Hallier-Vanuxeem D, et al. Case study: adapting *in vitro* blood-brain barrier models for use in early-stage drug discovery. *Drug Discov Today* 2012;17(7-8):285-290
- 60 Garg T, Singh O, Arora S, et al. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2012;29(1):1-63
- 61 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. *中国医药指南* 2019;17(14):54-58