

# 血-视网膜屏障体外模型建立方法的研究进展

吴绵绵, 张智, 张琰

(天津医科大学眼科医院, 天津医科大学眼科研究所, 天津医科大学眼视光学院,  
天津 300384)

**摘要:** 血-视网膜屏障 (blood-retinal barrier, BRB) 是一种重要的血-眼屏障, 在视网膜能量代谢中发挥重要作用。此外, BRB 结构与功能的重要性在眼病研究领域逐渐受到重视。然而, 目前暂未建立较成熟且全面的 BRB 体外模型, 造成视网膜疾病发病机制及药物疗效研究的不便。本文将对部分 BRB 体外模型的建立方法进行总结, 旨在为视网膜疾病研究模型的选择提供思路, 同时希望对 BRB 体外模型的完善有所启迪。

**关键词:** 眼科学; 血-视网膜屏障; 综述; 体外模型; 视网膜疾病

中图分类号: R774.1 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2018)23-2338-08

## Research advances on the establishment method of an *in vitro* model of blood-retinal barrier

WU Mianmian, ZHANG Zhi, ZHANG Yan

(Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin Medical University Eye Institute, School of Optometry and Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** The blood-retinal barrier (BRB) is a vital part of blood-ocular barrier, which plays an essential role in the energy metabolism of the retina. In addition, the importance of BRB structure and function has been received attention in the studies of retinopathy. Nevertheless, a relatively mature and comprehensive BRB *in vitro* model has not been established yet, resulting in the inconvenience of the experiments on pathogenesis and drug therapeutic effects in retinopathy. Here, this paper will summarize some methods for establishing BRB *in vitro* models to provide ideas for the selection of models varying with retinopathy, and to inspire the improvement of BRB *in vitro* models.

**Key words:** ophthalmology; blood-retinal barrier; review; *in vitro* model; retinopathy

## 0 引言

血-眼屏障由血-房水屏障和 BRB 构成<sup>[1]</sup>。BRB 具有调节视网膜毛细血管内物质运输, 维持神经稳态, 保护神经组织免受潜在的血液传播毒性等作用。BRB 的完整性与视网膜的结构和功能联系紧密<sup>[2]</sup>。越来越多的证据表明, BRB 的损伤造成血管通透性改变, 并且与多种致盲性视网膜疾病的病理生理过程高度相关, 包括糖尿病性视网膜病变<sup>[3]</sup>、视网膜黄斑变性<sup>[4]</sup>等。建立 BRB 体外模型, 从而模拟各类型视网膜疾病的病理改变是其机制研究的重要桥梁。并且, 体外模型与动物模型相比具有显著优势, 例如: 动物模型造模周期长、饲养成本高, 而且实验受到动物生理状态、环境等因素的限制, 变量不易调控<sup>[5]</sup>。相对而言, 体外模型变量单一, 受机体调节的影响较小, 易于筛选出参与疾病的靶点分子; 此外, 在涉及基因靶标研究时, 体外模型的基因敲除与插入更为简单易行<sup>[6]</sup>。

基金项目: 天津市大学生创新创业训练计划 (201710062003); 天津市自然科学基金重点项目 (17JZDJJC35600)

作者简介: 吴绵绵 (1993—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 糖尿病视网膜病变

通信联系人: 张琰, 研究员, 主要研究方向: 糖尿病视网膜疾病的有效干预靶点及其机制. E-mail: yanzhang04@tmu.edu.cn

基于以上优势, 体外模型具有不可替代性。因此, 寻找较理想的 BRB 体外模型具有重要意义。本文将就目前常见的几类 BRB 体外模型的构建方法进行总结, 为完善视网膜疾病的研究手段提供思路。

## 1 血-视网膜屏障的组成与作用

### 1.1 组成

BRB 在结构上可分为内屏障和外屏障。内屏障是由毛细血管内皮细胞组成的复杂系统, 包括粘连小带和闭锁小带构成的紧密连接, 并且视网膜微血管内皮细胞 (retinal microvascular endothelial cells, RMECs) 嵌入基底膜并被星形胶质细胞末端环绕。外屏障则由视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞及其之间的紧密连接构成<sup>[7]</sup>。

### 1.2 作用

#### 1.2.1 维持内环境稳态

BRB 不是绝对的障碍, 并不阻止所有跨内皮的物质转运。内层 BRB 可高选择性地调节内源性或外源性物质的扩散, 抑制血液渗透, 维持视网膜内环境相对独立的稳态<sup>[8]</sup>。此外, 视网膜组织是体内能量需求最高的系统之一, 可消耗机体基础代谢的 8%<sup>[9]</sup>。BRB 中, 神经元活动的能量来源于内皮细胞提供的充足氧气和葡萄糖<sup>[10]</sup>。外层 BRB 中的 RPE 细胞负责视网膜与脉络膜血管之间的营养物质输送, 可释放对神经视网膜有营养作用的因子, 同时可吞噬由光感受器外节脱落的膜盘<sup>[11]</sup>, 促进光感受器细胞的分化和存活<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.2 非侵入性药物输送

近年来, 眼内药物注射治疗的方式受到关注。眼部存在严格的保护性屏障, 向眼后组织递送药物仍面临较大挑战。目前, 临床治疗中经玻璃体途径给药可发挥一定疗效。但该手段具有侵袭性, 可造成眼部并发症, 如眼内炎、玻璃体出血、视网膜脱离等, 该方法仍伴随较大风险<sup>[13]</sup>。因此, 经循环系统给药成为另一重要手段。但由于 BRB 这一天然屏障的存在, 非侵入性给药途径的实施仍存在问题。因此, 如何使药物能高效到达视网膜作用部位成为 BRB 研究的一个重要方向。

## 2 BRB 体外模型

### 2.1 单一细胞模型

#### 2.1.1 原代视网膜细胞培养

通过原代细胞培养建立的 BRB 体外模型, 其来源主要包括两大类: 1) 人源细胞, 例如 RMECs<sup>[14]</sup>、RPE 细胞<sup>[15]</sup>等; 2) 动物源性细胞, 主要为鼠、兔、牛等动物视网膜细胞<sup>[16]</sup>。现以牛视网膜周细胞原代培养<sup>[17]</sup>为例介绍 BRB 体外模型的建立方法。

##### 2.1.1.1 原代视网膜细胞制备方法

将牛供体眼球浸泡于 1×必妥碘消毒液中, 灭菌 15 min, 剪去多余的眼眶脂肪和肌肉组织, 用 15 号手术刀在虹膜后约 5 mm 处做一切口, 沿此距离将整个眼球剪开, 去除前节、玻璃体和 RPE 层。用冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗视网膜数次, 加入 1 mL 酶溶液[含 1 021.02 U/mL II 型胶原酶和 0.25% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 PBS], 用移液管吹打数次后, 再加入 13 mL 酶溶液继续吹打。将培养皿置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1 h。然后, 将视网膜消化物通过 100 μm 孔径的细胞过滤器, 将过滤

所得样本转移到离心管中,加入清洗液(含1 g/L 葡萄糖的DMEM培养基,且补充有100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素、0.025 mg/mL 制霉菌素和5%FBS),2 000 r/min 离心4 min.重悬细胞经70  $\mu$ m 孔径过滤后,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中过夜孵育。经培养比较后筛选出最适宜周细胞生长的小牛血清。鉴于内皮细胞和周细胞对消化处理表现出不同的粘附力,可在5 min 内用PBS-乙二胺四乙酸(EDTA)混合液消化,去除内皮细胞,获得纯化的周细胞并孵育于生长培养基中(含1 g/L 葡萄糖DMEM,补充有100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素、2 mmol/L L-谷氨酰胺、10%体积分数的小牛血清)。

### 2.1.1.2 原代视网膜细胞模型评估

通常,动物源性的原代细胞虽可保持部分生理功能,但制备时需要新鲜取材,难以大量生产;而且相对于人眼,其在生理状态及基因组结构方面仍有较大差异。人源原代细胞可在最大程度上与生理状态下的人眼细胞保持一致<sup>[18]</sup>。然而,原代细胞的制备需要眼球供体,而健康的人眼资源稀少,原代培养物可表现出由供体变异(如年龄、性别等)引起的生理差异。此外,原代培养在实验初期通常需要进行纯化,且仅可保持有限的存活时间。

### 2.1.2 ARPE-19 细胞系

ARPE-19 细胞系是应用较广泛的自发永生化人 RPE 细胞。永生化的 ARPE-19 自发产生于 1 例 19 岁男性供体的原代 RPE 细胞培养物。1996 年, DUNN 等<sup>[19]</sup>对 ARPE-19 细胞的结构和功能特性进行了表征。

#### 2.1.2.1 ARPE-19 细胞系制备方法

供体死亡后 2 h 取出眼球,冷藏 12 h.经无钙镁离子但含有 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素的 Puck's 盐溶液清洗后,去除眼前节及视神经,将视网膜浸泡于含有 0.25%胰蛋白酶、0.1%透明质酸酶和 2%鸡血清的 Hank's 平衡盐溶液中,37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min.将分离出的 RPE 细胞转移到培养基中(DMEM 和 Nutrient Mixture F12 进行 1:1(体积比)混合,并添加含 20% FBS、0.348%碳酸氢钠、1% L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液)。将细胞以 800g 离心,培养基重悬后接种于培养瓶中。原代培养物在 37 $^{\circ}$ C、10%CO<sub>2</sub> 环境中孵育 2 d,之后每周更换培养基。随后发现,与其他 RPE 细胞培养物相比,这种特定培养物生长旺盛,有丰富的色素沉着和多边形细胞表达。用胰蛋白酶反复消化数次,去除粘附较弱的细胞及成纤维细胞,得到纯化的具有 RPE 细胞特性的 ARPE-19。

#### 2.1.2.2 ARPE-19 细胞系模型评估

以 ARPE-19 细胞系为基础建立的模型作为外层 BRB 的替代物已得到广泛应用<sup>[20]</sup>。该细胞系可形成稳定的单层,并具有与原始 RPE 细胞相似的表型特征。该模型培养方法简单易行,细胞系可大量获得。不足的是,ARPE-19 细胞系在体外单层培养时,屏障效果不明显,跨上皮细胞电阻在培养 4 周后才达到峰值,且远远低于原代培养的人胚胎 RPE 细胞的电阻值,不利于模拟药物与视网膜渗透性的相关研究<sup>[21]</sup>。

### 2.1.3 可表达黑色素的 MDCK 细胞系

通过慢病毒转染构建可表达黑色素的 MDCK (pigmented MDCK, P-MDCK) 细胞系, P-MDCK 同时携带酪氨酸酶和 P-蛋白的基因,模拟外层 BRB 以研究 RPE 细胞与脉络膜黑色素的结合对溶质渗透作用的影响<sup>[22]</sup>。

#### 2.1.3.1 可表达黑色素的 MDCK 细胞系制备方法

酪氨酸酶和 P-蛋白是黑色素合成的关键分子。首先,构建人源酪氨酸酶表达载体,将酪氨酸酶基因

插入到 pJ201 质粒中。质粒经 *Xho* I/*Eco*R I 双酶切后, 将分离出的人酪氨酸酶基因克隆到逆转录病毒表达载体小鼠干细胞病毒内部核糖体进入位点序列 (internal ribosome entry site, IRES) CD8 (MiCD8) 的 *Xho* I/*Eco*R I 位点。同时, 人源 P-蛋白基因插入质粒 pOTB7 后, 用 *Mfe* I/*Bam*H I 消化以获得全长人源 P-蛋白 cDNA, 然后将 cDNA 克隆到小鼠干细胞病毒 IRES 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的 *Bgl* II/*Eco*R I 位点。

随后, 用 pCL-Eco 包被的质粒和酪氨酸酶、P-蛋白逆转录病毒载体转染人胚肾 T 细胞, 产生高滴度的逆转录病毒。将获得的逆转录病毒转染 MDCK 细胞。操作如下: MDCK 细胞在 24 孔板中孵育 48 h, 待细胞密度达 80% 后, 用表达 P-蛋白的逆转录病毒、聚凝胺 (8  $\mu$ g/mL) 感染 MDCK 细胞; 在感染后 48 h, 更换培养基并培养细胞至第 4 代; 用流式细胞术分选出同时表达 P-蛋白和 GFP 的 MDCK 细胞。同理, 将酪氨酸酶基因导入到纯化的表达 P-蛋白的 MDCK 细胞中。感染的稳定表达酪氨酸酶的 MDCK 细胞也表达病毒 IRES 携带的 CD8。使用 Cy5 标记抗体检测 CD8, 并通过流式细胞仪分选双重转染的细胞。

### 2.1.3.2 可表达黑色素的 MDCK 细胞系模型评估

脉络膜生成的黑色素与 RPE 细胞共同阻碍了眼后极部的药物输送。研究表明, 脂质类药物分子对黑色素脉络膜-RPE 层屏障的渗透作用显著低于无色素的脉络膜-RPE 结构<sup>[23]</sup>。结果显示, P-MDCK 细胞表达酪氨酸酶和 P-蛋白, P-MDCK 的黑色素合成具有酪氨酸浓度依赖性。跨上皮电阻检测显示, P-MDCK 组电阻值与无转染 MDCK 组相近, 且近似于人源 RPE 细胞的电阻值。此外, 当培养基中酪氨酸浓度为 2 mmol/L 时, P-MDCK 对黑色素高亲和力药物氯喹的摄取显著增加, 但跨上皮运输作用显著低于 MDCK 组<sup>[22]</sup>。以上结果表明, 构建的 P-MDCK 模型还原了外层 BRB 中 PRE 层与黑色素共同产生的屏障作用。

### 2.1.4 永生化的视网膜微血管内皮细胞

人视网膜微血管内皮细胞 (human retinal microvessel endothelial cells, hRMECs) 经人端粒酶永生改良后可建立内层 BRB 体外模型<sup>[24]</sup>。

#### 2.1.4.1 永生化的 hRMECs 制备方法

细胞分裂过程涉及端粒的损伤变短。端粒酶是维持干细胞和癌细胞端粒长度的酶<sup>[25]</sup>。细胞永生策略是将人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 导入细胞中, 使细胞寿命延长。从人供体眼球中分离出眼球后段, 用无菌 PBS 洗涤, 刷洗去除 RPE 层, 获得视网膜神经感觉层 (neurosensory retina)。组织切碎后, 用 2 mg/mL I 型胶原酶消化并持续搅拌 30 min。将获得的细胞悬浮液用微血管内皮细胞培养基洗涤数次, 以 50%~60% 的密度接种于 6 孔板中。根据 Lipofectamine 试剂盒操作步骤, 用编码全长 hTERT 的 pGRN145 质粒转染原代培养的 hRMECs。用 200  $\mu$ g/mL 潮霉素 B 筛选转染成功的 hRMECs-hTERT 细胞。

#### 2.1.4.2 永生化的 hRMECs 模型评估

转染后细胞的初步表征显示, hRMECs-hTERT 细胞具有典型的内皮细胞鹅卵石样形态, 表达活化的端粒酶且细胞增殖能力强, 且保持了二倍体核型, 体外培养可生长至少 22 代。并且这些细胞可分化为神经元和胶质细胞表型, 分别表达神经元标记物微管相关蛋白-2 及星形细胞标记物胶质纤维酸性蛋白。经端粒酶永生化的 hRMECs 保持了正常的内皮表型, 同时表现出遗传稳定性, 较好地解决了原代细胞寿命短且易与 RPE 细胞交叉污染等问题。

## 2.2 多种细胞混合培养模型

### 2.2.1 非接触式细胞共培养

TRETIACH 等<sup>[26]</sup>将牛来源的 Müller 胶质细胞与视网膜内皮细胞 (retinal capillary endothelial cells, RCECs) 混合培养, 构建非接触式内屏障模型。

#### 2.2.1.1 非接触式细胞共培养制备方法

从牛眼中分离视网膜 Müller 细胞, 培养于补充有 2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素及 20% FBS 的 DMEM 培养基中。选用 1~2 代 Müller 细胞进行实验。用酶消化方法获得 RCECs, 细胞先接种到培养皿中, 用复合培养基 (15% 人血小板缺乏血清, 20 μL/mL 牛视网膜提取物, 90 μg/mL 肝素, 0.2 μg/mL 胰岛素, 2.5 μg/mL 转铁蛋白, 5 μg/mL 维生素 C, 100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素) 孵育。通过流式细胞仪分选纯化 RCECs。选择带有 0.4 μm 孔径、聚碳酸酯滤膜包被有细胞外基质的 Transwell 孔板, 倒扣小室, 将 Müller 细胞接种于上室外底面, 37°C 的潮湿条件下培养 2 h。随后翻转小室, 使小室内底面朝上, RCECs 接种于上室的内底面。

#### 2.2.1.2 非接触式细胞共培养模型评估

Müller 细胞与 RCECs 的共培养揭示了 Müller 细胞对 RCECs 屏障的增强作用并不涉及细胞的直接接触<sup>[26]</sup>。共培养模型包括直接共培养和非接触式共培养, 这类模型有助于探究 BRB 中多种细胞之间的相互作用。例如, McUSIC 等<sup>[27]</sup>构建胚胎干细胞与 RPE 细胞接触式混合培养模型, 探究视网膜再生的可能性。另一方面, 通过 Transwell 孔板建立的非接触式共培养模型是常见的 BRB 体外模型<sup>[28]</sup>。例如脉络膜血管内皮细胞与 RPE 细胞非接触式细胞模型显示, 可溶性血管内皮生长因子可促进脉络膜内皮细胞跨 RPE 单层的迁移能力, 但不影响内皮细胞增殖<sup>[29]</sup>; hRMECs 与胚胎干细胞衍生的 RPE 细胞共培养可用于药物渗透性实验<sup>[30]</sup>。

### 2.2.2 三层细胞模型

用羊膜模拟 Bruch's 膜, 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein derived endothelial cells, HUVECs) 代表脉络膜血管内皮, 并将二者与 ARPE-19 细胞共培养, 构成具有 3D 结构的 BRB 外屏障模型<sup>[31]</sup>。

#### 2.2.2.1 三层细胞模型制备方法

将新鲜获得的人胎盘转移到含 200 U/mL 青霉素和 200 mg/mL 链霉素的无菌瓶中, 4°C 存放 24 h。将羊膜与绒毛膜钝性分离, 获得光滑、半透明的羊膜。MINUSHEETS 装置固定羊膜后, 4°C 储存。将人脐带用 0.5 mg/mL II 型胶原酶溶液灌注消化, 以获得原代 HUVECs 进行培养。用蒸馏水中和羊膜的天然上皮, 去除羊膜上的所有细胞。将 ARPE-19 细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度接种于羊膜上皮表面。经 24 h, ARPE-19 形成紧密的单层细胞排列。翻转羊膜, 将 HUVECs 以  $1 \times 10^5$  个/mL 接种到另一表面, HUVECs 在 48 h 后形成稳定单层排列。HUVECs 接种面朝上, ARPE-19 细胞接种面朝下, 将三层结构放置在双灌注室装置中, 上室和下室分别含有 HUVECs 或 RPE 细胞培养基。每天更换培养基。

#### 2.2.2.2 三层细胞模型评估

该模型模拟了眼部 RPE 层-脉络膜复合体结构及其屏障功能, 可限制小分子物质 (<4 ku) 的运输, 还可以从上、下室分别收集培养基, 以分析不同细胞的因子分泌水平<sup>[31]</sup>。亦有研究表明, RPE 细胞接种

于 Bruch's 膜类似物丝素蛋白膜上, 可作为临床前研究的可靠模型<sup>[32]</sup>。因此, RPE 与 Bruch's 膜及脉络膜的共培养模型有助于深入研究外屏障分子机制。

### 2.2.3 RPE-脉络膜复合体的仿生模型

CHUNG 等<sup>[33]</sup>通过 3D 微流体技术, 构建体外具有 RPE-脉络膜复合体表型和功能的仿生模型。

#### 2.2.3.1 RPE-脉络膜复合体仿生模型构建方法

通过微流体技术生成可灌注的 3D 血管网, 重建 RPE-脉络膜复合体。微流体装置分为 2 个中心通道和 2 个旁通道。将抑肽酶和纤维蛋白原溶解于 PBS 中, HUVECs 与人源肝脏成纤维细胞用培养基重悬后, 以 1:3 的体积比与纤维蛋白溶液混合, 随后按 1:50 的体积比与凝血酶制成混合液, 注入中心血管通道, 形成可灌注的血管网以代表脉络膜血管网。在脉络膜血管网和 RPE 层之间为厚度可调的纤维蛋白凝胶层, 且最佳间隙尺寸为 300  $\mu\text{m}$ 。将 ARPE-19 细胞附着到纤维蛋白凝胶壁上, 形成代表 RPE 的单层细胞。总之, 该系统通过微流体装置模拟脉络膜血管网, 并且构建毗邻的 RPE 单层结构, 培养 7 d 后可较好地还原外层 BRB 的生物学结构和功能。

#### 2.2.3.2 RPE-脉络膜复合体仿生模型评估

该模型成功模拟了外层 BRB 的屏障作用, 并且保留了外屏障分泌生长因子(如色素上皮衍生因子、血管内皮生长因子)的能力, 优于培养皿或 Transwell 培养模型。3D 的立体结构有助于观察脉络膜的形态学改变, 并可直接模拟脉络膜新生血管病变的血管出芽改变, 有助于验证和筛选抗新生血管生成药物的作用。

## 3 结论与展望

疾病过程涉及体内复杂的病理改变, 而体外模型是病理基础、机制研究和新型治疗手段研究的重要辅助方式。上述各类模型在稳定性、分子表达水平、结构组成和不同疾病病理状态模拟等方面各有利弊。原代细胞可短暂保持原有的生物学特性, 但受限于人眼供体资源的匮乏; ARPE-19 细胞系自发永生, 但其紧密连接较弱, 不利于 BRB 屏障作用的研究。随着技术的不断提高, BRB 体外模型也得到逐步完善。P-MDCK 模型的构建考虑了 RPE 与脉络膜黑色素的作用; hRMECs 经改良后使细胞寿命延长。同时, 多种细胞共培养模型及 3D 的外屏障模型较全面地再现了 BRB 结构和功能特征, 有助于细胞相互作用或渗透性研究。在体外实验中, 可根据不同的研究目的而选择更适宜的细胞模型。

### [参考文献] (References)

- [1] CUNHA-VAZ J G. The blood-ocular barriers: past, present, and future[J]. *Doc. Ophthalmol.*, 1997, 93(1-2): 149-157.
- [2] GONZALEZ-MARISCAL L, RAYA-SANDINO A, GONZALEZ-GONZALEZ L, et al. Relationship between G proteins coupled receptors and tight junctions[J]. *Tissue Barriers*, 2018, 6(1): e1414015.
- [3] GONCALVES A, ALMEIDA L, SILVA A P, et al. The dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor sitagliptin ameliorates retinal endothelial cell dysfunction triggered by inflammation[J]. *Biomed. Pharmacother.*, 2018, 102: 833-838.
- [4] CUNHA-VAZ J. The blood-retinal barrier in the management of retinal disease: EURETINA award lecture[J]. *Ophthalmologica*, 2017, 237(1): 1-10.
- [5] ALI Z, CHANDRASEKERA P C, PIPPIN J J. Animal research for type 2 diabetes mellitus, its limited translation for clinical benefit, and the way forward[J]. *Altern. Lab. Anim.*, 2018, 46(1): 13-22.
- [6] WISNIEWSKA-KRUK J, van der WIJK A E, van VEEN H A, et al. Plasmalemma vesicle-associated protein has a key role in

- blood-retinal barrier loss[J]. *Am. J. Pathol.*, 2016, 186(4): 1044-1054.
- [7] VINOES S A, KUCHLE M, DEREVJAIK N L, et al. Blood-retinal barrier breakdown in retinitis pigmentosa: light and electron microscopic immunolocalization[J]. *Histol. Histopathol.*, 1995, 10(4): 913-923.
- [8] KUBO Y, AKANUMA S I, HOSOYA K I. Recent advances in drug and nutrient transport across the blood-retinal barrier[J]. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2018, 14(5): 513-531.
- [9] NIVEN J E, LAUGHLIN S B. Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems[J]. *J. Exp. Biol.*, 2008, 211: 1792-1804.
- [10] DIAZ-CORANGUEZ M, RAMOS C, ANTONETTI D A. The inner blood-retinal barrier: cellular basis and development[J]. *Vision Res.*, 2017, 139: 123-137.
- [11] FROST L S, MITCHELL C H, BOESZE-BATTAGLIA K. Autophagy in the eye: implications for ocular cell health[J]. *Exp. Eye Res.*, 2014, 124: 56-66.
- [12] CECHMANEK P B, McFARLANE S. Retinal pigment epithelium expansion around the neural retina occurs in two separate phases with distinct mechanisms[J]. *Dev. Dyn.*, 2017, 246(8): 598-609.
- [13] SHAH C P, GARG S J, VANDER J F, et al. Outcomes and risk factors associated with endophthalmitis after intravitreal injection of anti-vascular endothelial growth factor agents[J]. *Ophthalmology*, 2011, 118(10): 2028-2034.
- [14] 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[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(4): 749-754.
- LI J Q, JIANG J B, LUO Y, et al. Barrier function of human retinal microvascular endothelial cells cultured *in vitro*[J]. *Chin. J. Pathophys.*, 2009, 25(4): 749-754. (in Chinese)
- [15] VALEMBOIS S, KRALL J, FROLUND B, et al. Imidazole-4-acetic acid, a new lead structure for interaction with the taurine transporter in outer blood-retinal barrier cells[J]. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2017, 103: 77-84.
- [16] KADAM R S, CHERUVU N P, EDELHAUSER H F, et al. Sclera-choroid-RPE transport of eight beta-blockers in human, bovine, porcine, rabbit, and rat models[J]. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2011, 52(8): 5387-5399.
- [17] PRIMO V A, ARBOLEDA-VELASQUEZ J F. Isolation and transfection of primary culture bovine retinal pericytes[J]. *Methods Mol. Biol.*, 2016, 1430: 107-117.
- [18] VALTINK M, ENGELMANN K, STRAUSS O, et al. Physiological features of primary cultures and subcultures of human retinal pigment epithelial cells before and after cryopreservation for cell transplantation[J]. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 1999, 237(12): 1001-1006.
- [19] DUNN K C, AOTAKI-KEEN A E, PUTKEY F R, et al. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties[J]. *Exp. Eye Res.*, 1996, 62(2): 155-170.
- [20] MAUGERI G, D'AMICO A G, RASA D M, et al. Caffeine prevents blood retinal barrier damage in a model, *in vitro*, of diabetic macular edema[J]. *J. Cell Biochem.*, 2017, 118(8): 2371-2379.
- [21] GEISEN P, McCOLM J R, KING B M, et al. Characterization of barrier properties and inducible VEGF expression of several types of retinal pigment epithelium in medium-term culture[J]. *Curr. Eye Res.*, 2006, 31(9): 739-748.
- [22] KADAM R S, SCHEINMAN R I, KOMPELLA U B. Pigmented-MDCK (P-MDCK) cell line with tunable melanin expression: an *in vitro* model for the outer blood-retinal barrier[J]. *Mol. Pharm.*, 2012, 9(11): 3228-3235.
- [23] PESCINA S, SANTI P, FERRARI G, et al. *Ex vivo* models to evaluate the role of ocular melanin in trans-scleral drug delivery[J]. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2012, 46(5): 475-483.
- [24] KASHYAP M V, RANJAN A P, SHANKARDAS J K, et al. Establishment of human retinal microvascular endothelial cells with extended life-span[J]. *In Vivo*, 2013, 27(6): 685-694.
- [25] SEALEY D C, ZHENG L, TABOSKI M A, et al. The N-terminus of hTERT contains a DNA-binding domain and is required for telomerase activity and cellular immortalization[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2010, 38(6): 2019-2035.
- [26] TRETIACH M, MADIGAN M C, WEN L, et al. Effect of Müller cell co-culture on *in vitro* permeability of bovine retinal

- vascular endothelium in normoxic and hypoxic conditions[J]. *Neurosci. Lett.*, 2005, 378(3): 160-165.
- [27] McUSIC A C, LAMBA D A, REH T A. Guiding the morphogenesis of dissociated newborn mouse retinal cells and hES cell-derived retinal cells by soft lithography-patterned microchannel PLGA scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(5): 1396-1405.
- [28] 罗云, 孙桂波, 秦蒙, 等. 细胞共培养技术在医药研究中的应用[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37 (22) : 3345-3349.  
LUO Y, SUN G B, QIN M, et al. Application of cell co-culture techniques in medical studies[J]. *Chin. J. Chin. Mater. Med.*, 2012, 37(22): 3345-3349. (in Chinese)
- [29] GEISEN P, McCOLM J R, HARTNETT M E. Choroidal endothelial cells transmigrate across the retinal pigment epithelium but do not proliferate in response to soluble vascular endothelial growth factor[J]. *Exp. Eye Res.*, 2006, 82(4): 608-619.
- [30] SKOTTMAN H, MURANEN J, LAHDEKORPI H, et al. Contacting co-culture of human retinal microvascular endothelial cells alters barrier function of human embryonic stem cell derived retinal pigment epithelial cells[J]. *Exp. Cell Res.*, 2017, 359(1): 101-111.
- [31] HAMILTON R D, LEACH L. Isolation and properties of an *in vitro* human outer blood-retinal barrier model[J]. *Methods Mol. Biol.*, 2011, 686: 401-416.
- [32] SHADFORTH A M A, SUZUKI S, THEODOROPOULOS C, et al. A Bruch's membrane substitute fabricated from silk fibroin supports the function of retinal pigment epithelial cells *in vitro*[J]. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2017, 11(6): 1915-1924.
- [33] CHUNG M, LEE S, LEE B J, et al. Wet-AMD on a chip: modeling outer blood-retinal barrier *in vitro*[J]. *Adv. Healthc. Mater.*, 2018, 7(2). DOI: 10.1002/adhm.201700028.