

过表达 Claudin-5 增强体外培养的人视网膜微血管内皮细胞屏障功能

田 蓉, 刘秋慧, 蔡 萌, 李 静, 王 菁, 肖 伟, 罗 燕*
(中山大学中山眼科中心//眼科学国家重点实验室, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】探讨过表达 Claudin-5 后对视网膜血管内皮细胞屏障功能的影响。【方法】体外原代培养人视网膜血管内皮细胞(hRVEC)。当接种至 transwell 膜的 P2 ~ P5 代 hRVEC 近 60% 融合时进行慢病毒介导的转染实验。hRVEC 分为对照组, 慢病毒空载体组, 慢病毒介导的 Claudin-5 高表达转染组。荧光活细胞动态显微镜观察慢病毒介导的转染效率。Western Blot 检测各组细胞中 Claudin-5 表达水平。CCK8 法检测病毒转染对细胞的毒性。待接种至 transwell 膜的 hRVEC 培养 2 周后建立稳定的单层人视网膜血管内皮细胞屏障模型后, 电阻仪检测 hRVEC 屏障的跨内皮电阻(TER), 异硫氰酸荧光素右旋糖酐检测 hRVEC 屏障的通透性。【结果】慢病毒可以介导 Claudin-5 在 hRVEC 高表达, 其转染率达 60%, Western Blot 检测证实 Claudin-5 蛋白表达显著增加。CCK8 检测表明慢病毒转染不影响细胞的活性, 对细胞毒性小; 过表达 Claudin-5 后也不影响 hRVEC 的增殖; 过表达 Claudin-5 后能降低体外单层人视网膜血管内皮细胞屏障模型的通透性, 并提高其 TER。【结论】过表达 Claudin-5 后可以显著提高体外人视网膜血管内皮细胞屏障的功能, 这为视网膜血管性疾病的 治疗提供新思路。

关键词: 人视网膜血管内皮细胞; Claudin-5; 紧密连接; 屏障功能; 慢病毒转染

中图分类号: R34 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2014)05-0695-07

Over-expression of Claudin-5 Enhanced the In Vitro Barrier Function of Human Retinal Vascular Endothelial Cell

TIAN Rong, LIU Qiu-hui, CAI Meng, LI Jing, WANG Jing, XIAO Wei, LUO Yan*
(State Key Laboratory of Ophthalmology//Zhongshan Ophthalmic Center, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of over-expression of Claudin-5 on the in vitro barrier function of human retinal vascular endothelial cell(hRVEC). 【Methods】 hRVEC were isolated from human eyes and cultured. The second to fifth passage (P2-P5) hRVEC cultured on transwell membrane were conducted lentivirus-mediated transfection when the cells reached nearly 60% confluent. hRVEC cultured on transwell membrane were divided into three groups: control group, empty lentivirus vector group and lentivirus-mediated Claudin-5 transfection group. Red fluorescein protein was used as a report gene, and the efficiency of lentivirus-mediated transfection was observed under fluorescence microscopy. The protein level of Claudin-5 in each group was detected by western blot. CCK8 assay was used to determine the cell viability after lentivirus transfection. Two weeks after seeding on the transwell membrane, hRVEC established a stable in vitro monolayer barrier model. Trans-endothelial resistance (TER) of hRVEC barrier was measured by resistance meter. Barrier permeability was measured by fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-Dextran). 【Results】 Lentivirus could mediate the over-expression of Claudin-5 in hRVEC at about 60% transfection efficiency. A significant increased protein level of Claudin-5 was found in the Claudin-5 transfection group. The cell viability in each group detected by CCK8 did not changed, indicating no cytotoxicity of lentivirus-mediated transfection, and no influence of over-expression of claudin-5 on cell

收稿日期: 2014-05-01

基金项目: 国家自然科学基金(30872819, 81170864); 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-09-0809); 中山大学青年教师培育项目(10ykpy27)

作者简介: 田蓉, 硕士研究生; * 通信作者: 罗燕, 研究员, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病, E-mail: luoyan2@mail.sysu.edu.cn

proliferation. Over-expression of Claudin-5 significantly reduced the permeability of in vitro barrier model of hRVEC, and increased its TER. 【Conclusion】 Over-expression of Claudin-5 could significantly enhance the barrier functions of hRVEC. This study suggested over-expression of Claudin-5 might provide a new strategy for the treatment of retinal vascular diseases.

Key words: human retinal vascular endothelial cell; Claudin-5; tight junction; barrier function, lentivirus-mediated transfection

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(5):695-701]

随着对糖尿病视网膜病变、黄斑水肿、早产儿视网膜病变、视网膜中央静脉阻塞等世界范围内主要的致盲眼病发病机制的深入研究,各种因素如氧化应激、缺氧、炎症导致的血-视网膜内屏障(inner blood-retinal barrier, iBRB)的紧密连接(tight junction, TJ)的破坏被认为是引起这类视网膜血管性疾病渗漏、出血、水肿等发生发展的共同病理基础^[1]。血-视网膜内屏障由视网膜微血管内皮细胞间(retina vascular endothelial cell, RVEC)的连接构成。视网膜血管内皮细胞具有普通血管内皮细胞不具有的结构特点:极其丰富的 TJ^[2]。视网膜血管内皮细胞之间的 TJ 是血-视网膜内屏障结构与功能的基础,是维持和调节视网膜内屏障完整性、通透性的重要因素^[3]。TJ 跨膜蛋白 Claudins 为四次跨膜分子,是构成紧密连接骨架“嵴”最重要的部分^[4],能以同源或异源二聚体或多聚体的形式存在,在细胞屏障功能的维持中起重要作用^[5-6]。我们的前期研究发现在氧诱导视网膜病变小鼠模型中,病理性视网膜新生血管上 Claudin-5 异常分布^[7]。Claudin-5 主要存在于血管内皮细胞,在血脑屏障中占主导地位,暴露于缺氧环境中的小鼠, Claudin-5 表达降低,血脑屏障破坏,小分子物质通透性增加。因此,作为血管内皮细胞主要的紧密连接骨架蛋白 Claudin-5 对维持视网膜内屏障功能有着重要的作用。为此,本研究利用体外原代培养的 hRVEC 细胞和 transwell 培养体系建立体外稳定的单层 hRVEC 细胞屏障模型,通过慢病毒介导 Claudin-5 在 hRVEC 的过表达,探讨过表达 Claudin-5 后对 hRVEC 屏障功能的影响,对视网膜血管性疾病的治疗提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂及耗材

含以红色荧光蛋白(red fluorescein protein, RFP)为报告基因的 Lenti6.3-CLDN5-IRES2-RFP 慢病毒和 Lenti6.3-MCS-IRES2-RFP 阴性慢病毒

由上海英潍捷基公司制备;胰蛋白酶、血管内皮细胞培养液、I 型胶原酶、纤维连接蛋白、DMEM 培养液(美国 Invitrogen 公司); β -内皮细胞生长因子(美国 R&D 公司);CCK8(日本同仁公司);聚凝胺、异硫氰酸荧光素-右旋糖酐(fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-Dextran, 美国 sigma 公司);澳洲特级胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 美国 Thermo 公司);Transwell 培养板(美国 Corning 公司);FITC-凝血因子(Von Willebrand factor, vWF)抗体(美国 Abcam 公司);抗荧光衰减封片剂(北京普利来公司);鼠抗 Claudin-5 抗体(美国 Invitrogen 公司)、鼠抗 β -actin 抗体(美国 Abcam 公司);辣根过氧化物酶标记抗鼠 IgG(美国 Dako 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 hRVEC 的体外培养和免疫荧光鉴定 本实验已通过中山大学中山眼科中心伦理委员会审查批准。从健康供体眼球(中山大学中山眼科中心眼库提供)分离的视网膜组织用 D-Hank's 液清洗,剪碎后再用 2%胰蛋白酶 37℃消化 30 min, 10%FBS 的 DMEM 培养液终止消化, 1 100 r/min ($r = 25$ cm) 离心 8 min。弃上清,加入 0.1% I 型胶原酶 37℃消化 20 min, 1 100 r/min ($r = 25$ cm) 离心 8 min。弃上清,加入含 β -内皮细胞生长因子和 100 mL/L FBS 的内皮细胞培养液,接种纤维连接蛋白包被的培养皿中,培养箱内培养。

取 P2 代细胞,0.25%EDTA-胰蛋白酶消化后,接种于置有无菌盖玻片的 24 孔板中,待细胞爬满,灭菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)清洗 3 遍,无水乙醇固定 30min, PBS 洗 3 次,渗透打孔剂(含 0.1% Triton-X-100 的 1% BSA)打孔 5 min, PBS 洗 3 次, 1% BSA 室温下封闭 1h, 滴加 1:100 FITC-vWF 抗体, 4℃湿盒避光孵育过夜,避光 PBS 洗 3 次, DAPI 孵育 5 min, 避光 PBS 洗 3 次, 抗荧光衰减封片剂封片。取 P2~P5 的 hRVEC 用于下列实验研究。

1.2.2 慢病毒介导 Claudin-5 转染 hRVEC 细胞

将 hRVEC 以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞密度接种于孔径为 $0.4 \mu\text{m}$ 的 transwell 膜上, 随机分为正常对照组、慢病毒空载体组和慢病毒介导的 Claudin-5 高表达转染组。待细胞密度达到 60% ~ 70%, 清洗细胞, 换无血清培养液培养 2 h。病毒液冰上融解, 用无血清培养液按 $\text{MOI 值} = 3$ ($\text{MOI 值} = \text{加入病毒总数} / \text{细胞总数}$) 稀释, 并加入终浓度为 $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的聚凝胺, 混匀。Claudin-5 转染组加入 Claudin-5 阳性病毒液, 慢病毒空载体组加入阴性病毒液, 对照组加入无血清培养液, 培养箱中孵育 6 h 后换上完全培养基。转染后 72 h 活细胞动态荧光显微镜下拍照。

1.2.3 Western Blot 法检测 hRVEC 中 Claudin-5 蛋白的表达 接种于 Transwell 膜的 hRVEC, 培养 2 周后, 分别提取各组细胞的总蛋白。各孔加入 $80 \mu\text{L}$ 含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液, 冰上裂解 10 min, 加入 $20 \mu\text{L}$ 上样缓冲液, 混合均匀后 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 煮沸 10 min, 冰上急冷, 短暂离心。取蛋白样品于 SDS-PAGE 凝胶中电泳, 待目的蛋白接近凝胶底部时停止电泳, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 120 V 恒压电转移至 PVDF 膜上, 质量分数 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 对应条带分别孵育 1:250 稀释的 Claudin-5 抗体和 1:1 000 稀释的 β -actin 抗体 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, 漂洗后, 加入辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 二抗, 室温孵育 1 h 后用 ECL 定影、显影, 并扫描分析。

1.2.4 CCK8 法检测慢病毒对 hRVEC 细胞毒性 $2.5 \text{ g}/\text{L}$ 胰酶消化对照组、慢病毒空载体组与 Claudin-5 转染组细胞, 按 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞密度, 接种于 96 孔板。每组设 3 个复孔。12 h、24 h 后每孔加入 CCK8 溶液 $20 \mu\text{L}$ 和 DMEM 培养基 $180 \mu\text{L}$, 继续孵育 2 h。终止培养, 酶标仪 450 nm 波长下测各孔吸光度 OD 值。细胞存活率 = $\text{Claudin-5 转染组或慢病毒空载体组} / \text{正常对照组} \times 100\%$ 。

1.2.5 跨细胞膜电阻 (TER) 的检测 接种于 transwell 膜的 hRVEC, 培养 2 周后建立稳定的单层人视网膜血管内皮细胞屏障模型。EVOMX meter 电阻仪测量 TER, 调零电阻仪, 将电极浸没在电解质溶液, 垂直电极, 长电极在外部, 短电极在内部。每个小室取 3 个点, 测量 3 次取平均值。同时测量空白孔电阻。TER 计算公式: R (单位面积) = $(R - \text{滤膜基础电阻}) \times \text{有效膜面积}$ 。

1.2.6 FITC-Dextran 检测细胞通透性 接种于

transwell 膜的 hRVEC, 培养 2 周后建立稳定的单层人视网膜血管内皮细胞屏障模型。transwell 上室加入 FITC-dextran (4 ku) 使终浓度为 $1 \text{ mg}/\text{mL}$ 。培养箱孵育 4 h, 下室中取出 $50 \mu\text{L}$, $150 \mu\text{L}$ PBS 稀释, 酶标仪测量荧光 OD 值, 计算通透性计算公式为: $\text{下池的量} / \text{上池起始浓度} / \text{滤膜面积}$ 。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件对各实验数据进行统计分析, 所有数据均用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。对各组的样本均数行 W 检验证实符合正态分布。组间均数进行 Levene 方差齐性检验, CCK8 检测 hRVEC 生存率不满足方差齐性检验, 故行 Kruskal Wallis 秩和检验。Claudin-5 蛋白表达水平, TER 及通透性组间均数比较采用单因素方差分析, 多个样本均数的两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 认为差别具有统计学意义。

2 结果

2.1 hRVEC 的鉴定

原代生长的 hRVEC 融合后呈铺路石样外观 (图 1A)。vWF 为血管内皮细胞特异性标记标志蛋白, FITC-vWF 标记阳性的细胞呈绿色荧光, 即为血管内皮细胞, 结果提示所培养的细胞为 hRVEC (图 1B ~ D)。

2.2 慢病毒转染 hRVEC 细胞

hRVEC 细胞在 transwell 上单层融合生长 (图 2A, B)。慢病毒空载体组细胞表达红色报告基因, 转染效率约为 50% (图 2D)。慢病毒可以介导 Claudin-5 在 hRVEC 表达, 转染 72 h 后活细胞荧光显微镜下可见 Claudin-5 高表达转染组细胞显示红色荧光蛋白红色报告基因的红色荧光, 转染效率约达 60% (图 2E)。

2.3 Western Blot 检测 hRVEC 中 Claudin-5 蛋白表达水平

Western Blot 检测各组 hRVEC 中 Claudin5 蛋白表达 (图 3A)。过表达 Claudin-5 后可以明显增加 Claudin-5 蛋白表达, 为对照组的 2.4 倍。较对照组及慢病毒空载体组相比差异具有统计学意义 ($F = 5512, P < 0.01$, 图 3B)。对照组与空载体组 Claudin-5 的表达无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.4 过表达 Claudin-5 对细胞存活的影响

CCK8 法检测慢病毒介导的转染对 hRVEC 细

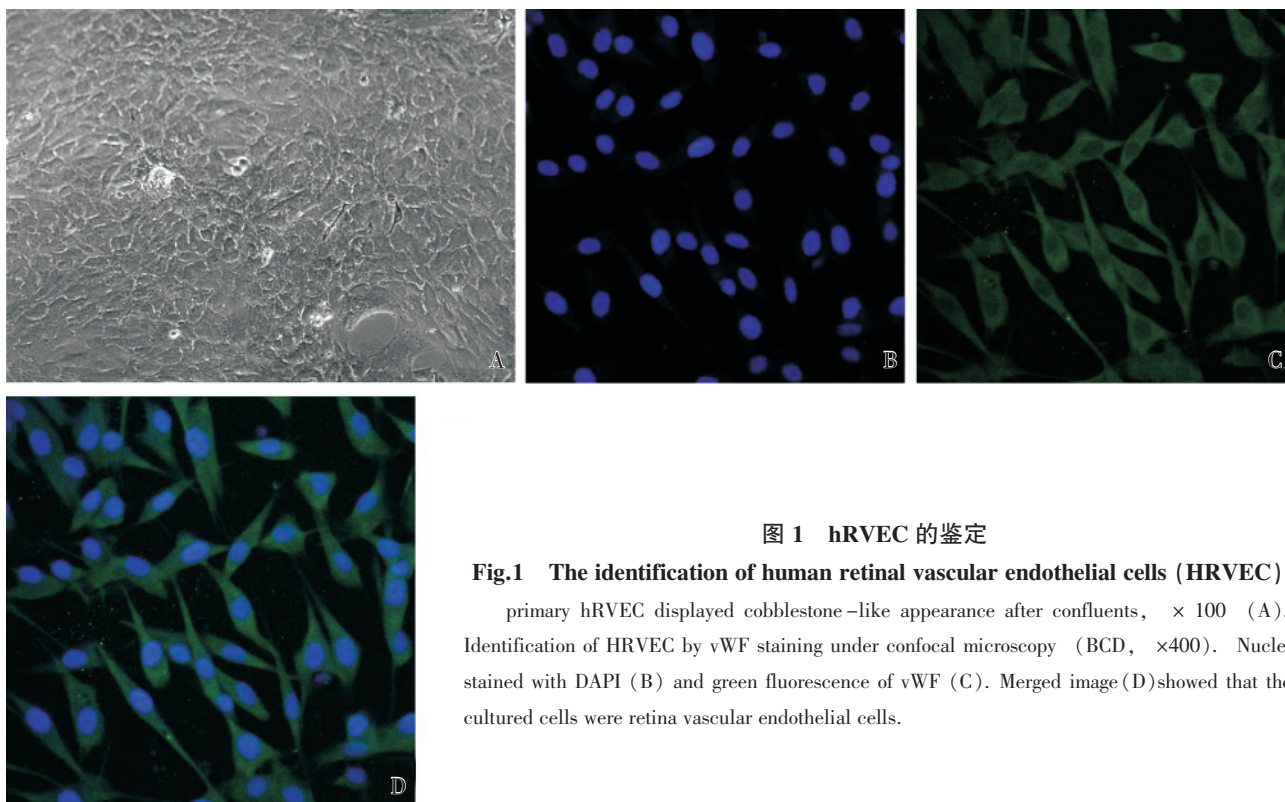


图 1 hRVEC 的鉴定

Fig.1 The identification of human retinal vascular endothelial cells (HRVEC)

primary hRVEC displayed cobblestone-like appearance after confluent, $\times 100$ (A). Identification of HRVEC by vWF staining under confocal microscopy (BCD, $\times 400$). Nuclei stained with DAPI (B) and green fluorescence of vWF (C). Merged image (D) showed that the cultured cells were retina vascular endothelial cells.

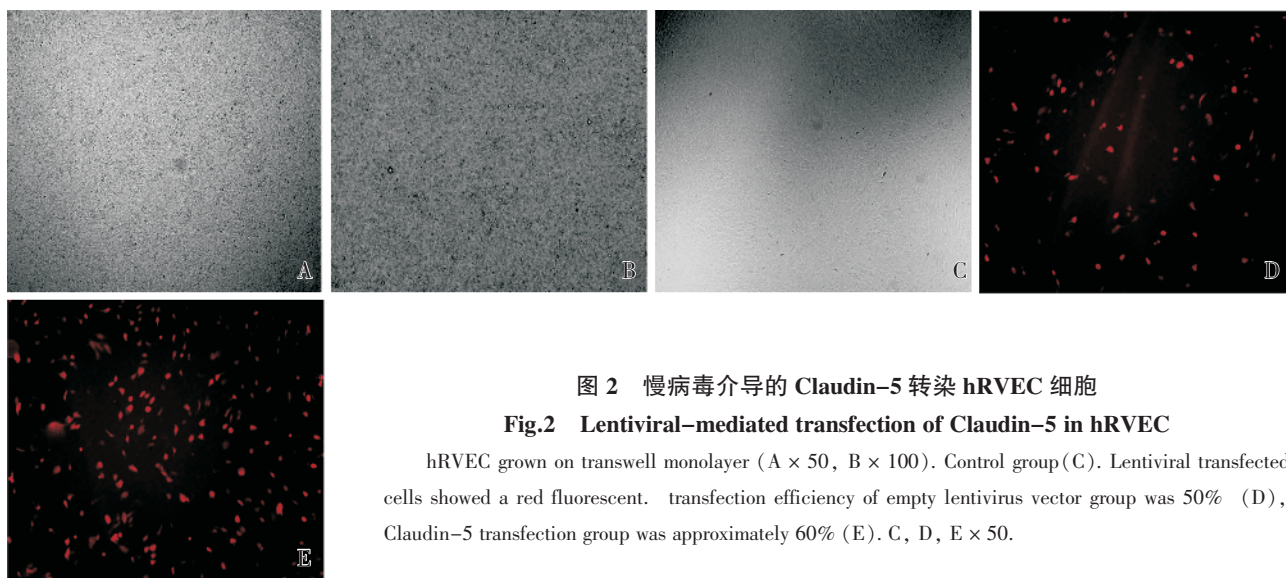


图 2 慢病毒介导的 Claudin-5 转染 hRVEC 细胞

Fig.2 Lentiviral-mediated transfection of Claudin-5 in hRVEC

hRVEC grown on transwell monolayer (A $\times 50$, B $\times 100$). Control group (C). Lentiviral transfected cells showed a red fluorescent. transfection efficiency of empty lentivirus vector group was 50% (D), Claudin-5 transfection group was approximately 60% (E). C, D, E $\times 50$.

胞毒性的影响, 结果所示 12 h 后对照组, 慢病毒空载体组, Claudin-5 转染组的细胞存活率为 1 、 1.021 ± 0.054 、 0.987 ± 0.037 ; 24 h 三组细胞存活率分别为 1 、 1.032 ± 0.029 、 1.036 ± 0.013 ; 3 组间细胞没有统计学差异 ($F_{12h} = 1.195$, $P > 0.05$, $F_{24h} = 2.483$, $P > 0.05$), 表明转染慢病毒对 hRVEC 细胞存活率没有影响, 病毒转染对细胞毒性小, 且过表达 Claudin-5 对细胞增殖没有影响 ($P > 0.05$, 图 4)。

2.5 过表达 Claudin-5 对 hRVEC 跨内皮细胞电阻的影响

病毒转染后, hRVEC 在 transwell 上培养 2 周建立稳定的单层屏障模型后检测 TER。正常对照组 TER 为 $(32.49 \pm 1.48) \Omega \text{cm}^2$, 慢病毒空载体组为 $(35.4 \pm 1.25) \Omega \text{cm}^2$, Claudin-5 转染组 TER 升高为 $(53.99 \pm 1.75) \Omega \text{cm}^2$, 较正常组与慢病毒空载体组相比, Claudin-5 转染组明显增加 TER, 增强细胞

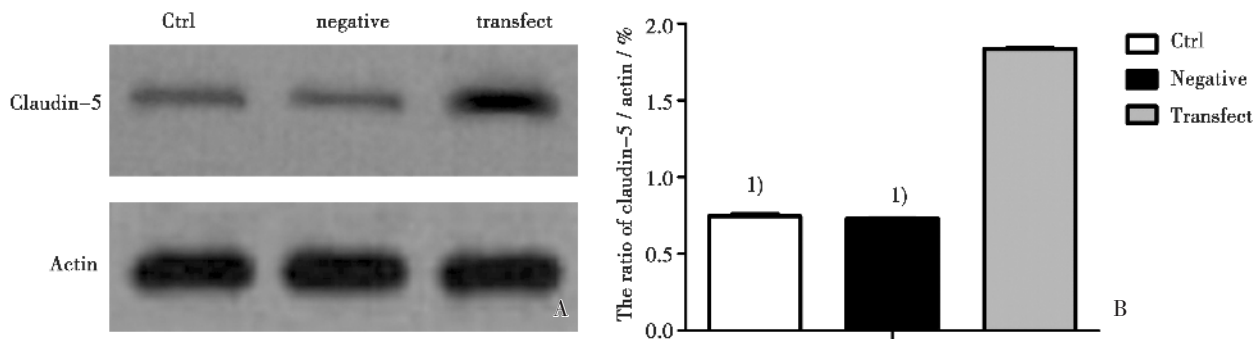


图 3 Western Blot 检测各组细胞 Claudin-5 蛋白表达水平

Fig.3 Western Blot detected the protein expression of Claudin-5

Lentiviral-mediated overexpression of Claudin-5, a significant increased protein level of Claudin-5 was found in the Claudin-5 transfection group (A). In the transfected group, the expression level of Claudin-5 was 2.4 folds of the control group, the difference was statistically significant (1) $P < 0.05$ vs. the transfect group) and no significant difference between the control group and the empty lentivirus vector group (B).

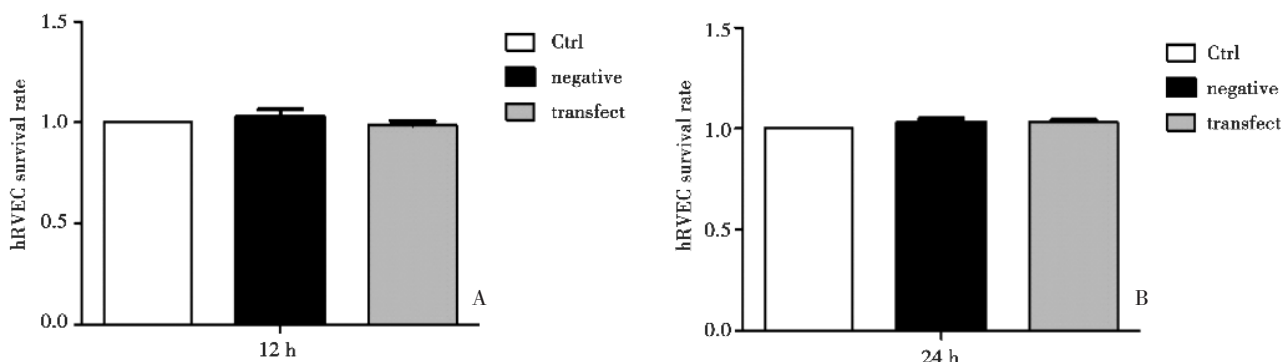


图 4 过表达 Claudin-5 对 hRVEC 存活率的影响

Fig.4 The influence of overexpression of Claudin-5 on hRVEC viability

The cell viability detected by CCK8 did not change after cultured for 12 h (A) and 24 h in each group (B).

的屏障功能,差异具有统计学意义 ($F = 60.733, P < 0.01$)。对照组与空载体组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 5)。

2.6 过表达 Claudin-5 对 hRVEC 通透性的影响

FITC-Dextran 检测 transwell 培养 2 周后 hRVEC 屏障的通透性。对照组通透性为 $(0.754 \pm 0.013) \text{mg}/(\text{mL} \cdot \text{cm}^2)$, 慢病毒空载体为 $(0.747 \pm 0.017) \text{mg}/(\text{mL} \cdot \text{cm}^2)$, Claudin-5 转染组通透性下降到 $(0.642 \pm 0.015) \text{mg}/(\text{mL} \cdot \text{cm}^2)$, 通透性较对照组及空载体组显著下降, 具有统计学意义 ($F = 33.978, P < 0.01$), 对照组与慢病毒空载体组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 6)。

3 讨论

各种炎性因子、活性氧簇 (ROS) 介导的氧化应激等能引发血管内皮细胞中各种信号级联反应, 而 TJ 是信号转导的一个效应器。因此, 视网膜血管内皮细胞 TJ 的损伤或功能丧失将直接影响 iBRB 的屏障功能^[8], 增加视网膜血管通透性, 进而引起血管渗漏、出血和水肿等一系列病理生理改变。跨膜蛋白是 TJ 的骨架结构, 主要由 Claudins、Occludins 和连接粘附分子组成。Claudins 是为 20-27 ku 的跨膜 4 次的跨膜蛋白^[9], 是构成 TJ 链的主

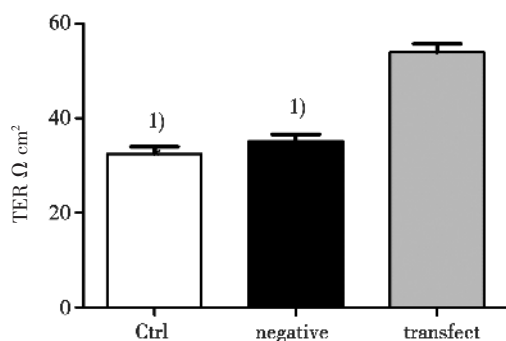


图 5 过表达 Claudin-5 对 hRVEC 屏障的 TER 的影响

Fig.5 The influence of overexpression of Claudin-5 on hRVEC TER

Overexpression of Claudin-5 could significantly improve the TER, enhance barrier function of hRVEC (1) $P < 0.05$ vs. the transfect group, there were no differences between the control group and the empty lentivirus vector group.

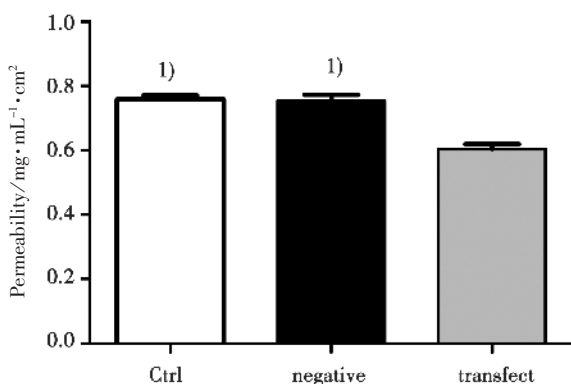


图 6 过表达 Claudin-5 对 hRVEC 屏障的 FITC-Dextran 通透性的影响

Fig.6 The influence of overexpression of Claudin-5 on hRVEC permeability

Overexpression of Claudin-5 significantly reduced the permeability in vitro barrier model of hRVEC (1) $P < 0.05$ vs. the transfect group, there were no differences between the control group and the empty lentivirus vector group.

要骨架,形成嵴线结构^[10-11]。Claudins 通过 ZO-1 与细胞骨架蛋白相连接,在炎症及应激状态下,导致肌动蛋白重排,所连接的紧密连接蛋白间的相互连接崩解,TJ 开放^[2]。不同的 Claudins 在不同器官组织的表达不同,在同一器官组织不同正常发育时期和病变时期的表达也不同^[12]。目前 Claudins 在上皮细胞及肿瘤细胞的 TJ 屏障中的作用中研究较多,但在视网膜血管内皮细胞的 TJ 中的作用

仍未完全阐明。Claudin-5 是经典的内皮细胞紧密连接蛋白,在血脑屏障的形成中占优势角色^[13]。在自身免疫性脑脊髓炎的动物模型中发现 Claudin-5 的表达降低,同时伴随着 VEGF-A 表达升高和血脑屏障的破坏。Claudin-5 不仅参与细胞屏障性能的调节,在乳腺癌细胞中还与细胞运动性有关。最近的研究表明 Claudins 在细胞生长和上皮间质转换上起作用^[14]。我们之前研究发现,在氧诱导增殖性视网膜病变的小鼠中,视网膜大量病理性新生血管生成,Claudin-5 蛋白表达发生动态变化,且在视网膜新生血管上异常分布,并伴有 iBRB 功能严重受损^[7]。

本研究显示 transwell 膜上低血清培养 hRVEC2 周后建立稳定的单层人视网膜血管内皮细胞屏障模型。慢病毒介导 Claudin-5 在难转染的原代 hRVEC 的转染效率为可达 60%,且提高 Claudin-5 的蛋白表达水平为对照组的 2.4 倍,说明慢病毒可介导 Claudin-5 在 hRVEC 中高表达。CCK8 检测细胞活性结果表明慢病毒介导的转染对 hRVEC 细胞毒性小,同时过表达 Claudin-5 也不影响细胞增殖。过表达 Claudin-5 后 hRVEC 的 TER 显著提高为对照组 1.6 倍,慢病毒空载体组与对照组间 TER 则无明显差异。研究表明“嵴线”的数量与 TER 有关^[15]。过表达 Claudin-5 后增加了 hRVEC 细胞的 TER,可能是过表达 Claudin-5 增加了紧密连接蛋白骨架“嵴”的数量,使相邻细胞间的联系更加紧密,锁紧 TJs,在外源性的 Claudin-5 基因转入上皮细胞 CaCo-2 中也发现 Claudin-5 增加 TER,提示 Claudin-5 在某些程度上能够绷紧上皮细胞屏障^[16]。Claudin-5 过表达能显著降低通透性,虽然细胞通透性并不与“嵴线”数量明显相关^[17-18],但与构成“嵴线”的 Claudins 的亚型相关^[19]。在视网膜的血管内皮细胞是无孔的,具有严格的离子选择性。过表达 Claudin-5 后限制了离子的通透,说明了 Claudin-5 参与了 hRVEC 屏障中离子选择通透性的调节。本研究证实 Claudin-5 在视网膜血管内皮细胞屏障中发挥着重要的正向作用,但是过表达 Claudin-5 后, hRVEC 细胞的亚显微结构的改变和屏障性能提高的具体机制还不清楚,有待进一步去探究。

综上所述,过表达 Claudin-5 可以显著的提高 hRVEC 细胞的屏障功能,证实 Claudin-5 在视网膜血管内皮细胞屏障中发挥着重要的正向作用,

这为视网膜血管性疾病的治疗提供新思路。

参考文献

- [1] Fruttiger M. Development of the retinal vasculature [J]. *Angiogenesis*, 2007, 10(2): 77-88.
- [2] Adamson P, Etienne S, Couraud PO, et al. Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway [J]. *J Immunol*, 1999, 162(5): 2964-2973.
- [3] Klaassen I, Hughes JM, Vogels IM, et al. Altered expression of genes related to blood-retina barrier disruption in streptozotocin-induced diabetes [J]. *Exp Eye Res*, 2009, 89(1): 4-15.
- [4] Staehelin LA. Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions [J]. *J Cell Sci*, 1973, 13(3): 763-786.
- [5] Ikari A, Atomi K, Takiguchi A, et al. Enhancement of cell-cell contact by claudin-4 in renal epithelial Madin-Darby canine kidney cells [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(2): 499-507.
- [6] Daugherty BL, Ward C, Smith T, et al. Regulation of heterotypic claudin compatibility [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(41): 30005-30013.
- [7] Luo Y, Xiao W, Zhu X, et al. Differential expression of claudins in retinas during normal development and the angiogenesis of oxygen-induced retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(10): 7556-7564.
- [8] Saker S, Stewart EA, Browning AC, et al. The effect of hyperglycaemia on permeability and the expression of junctional complex molecules in human retinal and choroidal endothelial cells [J]. *Exp Eye Res*, 2014, 121(9): 161-167.
- [9] Kitajiri SI, Furuse M, Morita K, et al. Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules, in the inner ear [J]. *Hear Res*, 2004, 187(1-2): 25-34.
- [10] Morita K, Furuse M, Fujimoto K, et al. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(2): 511-516.
- [11] Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 12): 2435-2447.
- [12] Holmes JL, Van Itallie CM, Rasmussen JE, et al. Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns [J]. *Gene Expr Patterns*, 2006, 6(6): 581-588.
- [13] Rizzolo LJ, Peng S, Luo Y, et al. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2011, 30(5): 296-323.
- [14] Escudero-Esparza A, Jiang WG, Martin TA. Claudin-5 participates in the regulation of endothelial cell motility [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 362(1-2): 71-85.
- [15] Steed E, Balda MS, Matter K. Dynamics and functions of tight junctions [J]. *Trends Cell Biol*, 2010, 20(3): 142-149.
- [16] Ohtsuki S, Sato S, Yamaguchi H, et al. Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 210(1): 81-86.
- [17] Gunzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability [J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(2): 525-569.
- [18] Stevenson BR, Anderson JM, Goodenough DA, et al. Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance [J]. *J Cell Biol*, 1988, 107(6 Pt 1): 2401-2408.
- [19] Furuse M, Furuse K, Sasaki H, et al. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells [J]. *J Cell Biol*, 2001, 153(2): 263-272.

(编辑 王晓鹰)