

益景汤调控 MMPs/TIMPs 相关分子拮抗高糖诱导的 iBRB 模型基底膜损害

赖思艺^{1,3}, 邱心悦^{1,3}, 何建忠^{1,4}, 王航², 孟春², 刘光辉^{1,4}

引用: 赖思艺, 邱心悦, 何建忠, 等. 益景汤调控 MMPs/TIMPs 相关分子拮抗高糖诱导的 iBRB 模型基底膜损害. 国际眼科杂志, 2024, 24(9): 1387-1391.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81774369); 福建省自然科学基金项目 (No. 2022J01352, 2023J01852)

作者单位: ¹(350004) 中国福建省福州市, 福建中医药大学附属人民医院眼科; ²(350108) 中国福建省福州市, 福州大学生物科学与工程学院生物技术工程系; ³(350004) 中国福建省福州市, 福建中医药大学第一临床医学院; ⁴(350004) 中国福建省福州市, 福建中医药大学中西医结合眼科研究所

作者简介: 赖思艺, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病的中西医结合防治。

通讯作者: 刘光辉, 毕业于温州医科大学, 博士, 主任医师, 副教授, 博士研究生导师, 研究方向: 眼底病的中西医结合防治。latiny@gmail.com

收稿日期: 2023-11-16 修回日期: 2024-07-25

摘要

目的: 观察益景汤拮抗高糖诱导的体外血-视网膜内屏障 (iBRB) 模型基底膜 (BM) 损害及机制。

方法: 分离、培养大鼠内皮细胞 (ECs) 和视网膜微血管周细胞 (RMPs) 构建体外 iBRB 模型, 随机分成低糖组、高糖组、米诺环素组、益景汤组, 分别予 25 mmol/L 葡萄糖、60 mmol/L 葡萄糖、60 mmol/L 葡萄糖 + 10 μg/mL 米诺环素、60 mmol/L 葡萄糖 + 10% 益景汤含药血清干预, 各组干预 12 h 后终止孵育。采用 Western blot 法检测各组 BM 相关蛋白 [IV 型胶原 (collagen IV, C IV)、层黏连蛋白 (laminin, LN)] 及 MMPs/TIMPs 相关蛋白 (MMP-2、MMP-3、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2) 的表达。

结果: 与低糖组相比, 高糖组、米诺环素组、益景汤组 C IV 蛋白表达增加, 高糖组、米诺环素组 LN 蛋白表达增加 (均 $P < 0.05$)。益景汤及米诺环素能够抑制高糖诱导的 C IV、LN 蛋白表达增加, 益景汤组、米诺环素组与高糖组相比具有差异 (均 $P < 0.05$)。与低糖组相比, 高糖组、米诺环素组 MMP-2、MMP-3、MMP-9 蛋白表达增加 (均 $P < 0.05$)。益景汤能够抑制高糖诱导的 MMP-2、MMP-3、MMP-9 蛋白表达增加, 益景汤组与高糖组相比具有差异 (均 $P < 0.05$)。低糖组、高糖组、米诺环素组、益景汤组各组之间 TIMP-1、TIMP-2 表达未见明显差异 (均 $P > 0.05$)。

结论: 益景汤可能通过调控 MMP-2、MMP-3、MMP-9、C IV、LN 的表达, 干预高糖介导的 BM 重塑, 抑制 iBRB 的损害, 从而干预 DR。

关键词: 益景汤; 糖尿病视网膜病变; 血-视网膜内屏障; MMPs/TIMPs; 基底膜

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2024.9.07

Yijing Decoction regulates MMPs/TIMPs - related molecules to antagonize high glucose - induced basement membrane damage in iBRB model

Lai Siyi^{1,3}, Qiu Xinyue^{1,3}, He Jianzhong^{1,4}, Wang Hang², Meng Chun², Liu Guanghui^{1,4}

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81774369); Natural Science Foundation of Fujian (No. 2022J01352, 2023J01852)

¹Department of Ophthalmology, Affiliated People's Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, Fujian Province, China; ²Department of Biotechnology and Engineering, College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, Fujian Province, China; ³First Clinical Medicine College, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, Fujian Province, China; ⁴Eye Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, Fujian Province, China

Correspondence to: Liu Guanghui. Department of Ophthalmology, Affiliated People's Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, Fujian Province, China; Eye Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, Fujian Province, China. latiny@gmail.com

Received: 2023-11-16 Accepted: 2024-07-25

Abstract

• **AIM:** To investigate the mechanism by which Yijing Decoction antagonist high glucose - induced damage to the basement membrane (BM) in an *in vitro* inner blood-retinal barrier (iBRB) model.

• **METHODS:** Rat retinal microvascular pericytes (RMPs) and endothelial cells (ECs) were isolated and cultured to establish an *in vitro* iBRB model. The cells were randomly divided into four groups: low glucose group (LG), high glucose group (HG), minocycline group (MG) and Yijing Decoction group (YG). The LG group received 25 mmol/L glucose, the HG group received 60 mmol/L glucose, the MG group received 60 mmol/L glucose + 10 μg/mL minocycline, and the YG group received 60 mmol/L glucose + 10% Yijing Decoction - containing serum. Incubation for each group were terminated after intervention for 12 h. Next, the Western blot analysis was performed to assess the protein expression of BM-related

proteins, including collagen IV (CIV) and laminin (LN), as well as matrix metalloproteinase (MMPs)/tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs) such as MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2.

• RESULTS: Compared to the LG group, the protein expressions of CIV increased in the HG, MG, and YG groups, as did LN in the HG and MG groups (all $P < 0.05$). Both Yijing Decoction and minocycline effectively inhibited the elevated expression of CIV and LN induced by high glucose, and the difference between the YG, MG, and HG groups was statistically significant (all $P < 0.05$). Furthermore, compared to the LG group, the protein expressions of MMP-2, MMP-3, and MMP-9 increased in the HG, MG, and YG groups (all $P < 0.05$). Yijing Decoction specifically attenuated the high glucose-induced increase in MMP-2, MMP-3 and MMP-9 protein expression, and there were statistically significant differences between the YG and HG group (all $P < 0.05$). No significant difference were observed in the expressions of TIMP-1 and TIMP-2 among the LG, HG, MG, and YG groups (all $P > 0.05$).

• CONCLUSION: Yijing Decoction can potentially intervene in DR by modulating the protein expression of MMP-2, MMP-3, MMP-9, CIV, and LN, suppressing high glucose-induced BM remodeling, and mitigating damage to iBRB.

• KEYWORDS: Yijing Decoction; diabetic retinopathy; inner blood-retinal barrier; matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of matrix metalloproteinases; basement membrane

Citation: Lai SY, Qiu XY, He JZ, et al. Yijing Decoction regulates MMPs/TIMPs-related molecules to antagonize high glucose-induced basement membrane damage in iBRB model. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024,24(9):1387-1391.

0 引言

血-视网膜内屏障(inner blood-retinal barrier, iBRB)主要由视网膜微血管周细胞(retinal microvascular pericytes, RMPs)、内皮细胞(endothelial cells, ECs)及基底膜(basement membranes, BM)构成,对于维持视网膜亚结构的完整及微环境的稳定等至关重要^[1]。iBRB破坏是糖尿病(diabetes mellitus, DM)视网膜并发症中最早出现的病理损害之一,并贯穿于糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的整个病理过程。因此,干预iBRB的损害对于防治DR具有重要的意义。益景汤是福建中医药大学附属人民医院眼科应用于DR防控的验方,临床研究表明该方能够改善DR患者iBRB功能及视网膜微循环^[2-3],动物研究表明益景汤能够降低DM大鼠iBRB的损害并减轻视网膜微血管管壁渗漏^[4]。但是其具体机制,尤其是对于iBRB的作用机制仍然有待深入发掘。BM的重塑受基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)和其特异性抑制剂(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs)复合体的调控。在本次研究中,我们通过高糖诱导iBRB体外模型的损害,观察了MMPs/TIMPs相关因子的表达,探讨了益景汤对iBRB基底膜的保护效应及机制,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性SD大鼠(清洁级),其中细胞培养取材用鼠为3周龄,体质量 40 ± 5 g,20只;含药血清制备用鼠为6周龄,体质量 200 ± 20 g,20只;饲养于福州大学生物科学与工程学院动物实验室,温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为50%-55%。实验动物购买自上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证号SCXK(沪)2017-0012]。实验动物的使用遵循国家科学技术委员会1988年颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要药品和试剂及仪器 益景汤(生黄芪15 g、山药15 g、苍术9 g、桃仁5 g、红花5 g等)由福建中医药大学附属人民医院制剂室提供,方药每1剂浓煎至25 mL备用。青霉素-链霉素双抗(10 kU/mL青霉素+10 mg/mL链霉素)、DMEM培养基购自美国HyClone公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司;内皮细胞专用培养基(endothelial cell medium, ECM)购自美国ScienCell公司;人工基质胶Matrigel购自美国BD公司;抗MMP-2抗体、抗MMP-3抗体、抗MMP-9抗体、抗IV型胶原(collagen IV, CIV)抗体、抗层黏连蛋白(laminin, LN)抗体购自美国Abcam公司;抗TIMP-1抗体、抗TIMP-2抗体购自美国Santa Cruz公司;24孔板及培养皿(美国Corning公司);CO₂细胞培养箱(美国NUARE公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞分离培养及iBRB体外模型构建 3%戊巴比妥钠过量麻醉处死大鼠,分别按照参考文献^[5]描述方法及团队研发的方法^[6]分离、纯化、培养、鉴定大鼠视网膜微血管ECs和RMPs。选用第3代至第7代经鉴定后的ECs和RMPs开展后续实验。参考我们团队既往研究方法^[7]将Matrigel用ECM培养基按照1:1进行稀释后加入培养板,置入细胞培养箱孵育30 min以上进行包被,待Matrigel凝固后备用。ECs和RMPs细胞浓度调整为 2×10^5 个/毫升,将ECs和RMPs按9:1进行混合加入Matrigel包被的培养板,置于细胞培养箱培养16 h构建体外iBRB模型备用,其中培养12 h时在培养板中见条索样结构形成即为建模成功。

1.2.2 益景汤含药血清的制备 20只6周龄大鼠予益景汤水煎液每天按10.71 g/kg配合PBS缓冲液稀释至2.5 mL灌胃,qd,共3 d,处死前1 h灌胃一次。腹腔注射3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)进行麻醉之后,从腹主动脉取血。取血后戊巴比妥钠过量麻醉处死大鼠。血液凝固后离心分离血清,灭活过滤除菌,分装后超低温冰箱储存备用。

1.2.3 分组及干预措施 前期预实验采用CCK-8法检测了不同浓度葡萄糖、米诺环素、益景汤含药血清对ECs增殖的影响,根据预实验结果设定了本研究各组别对应的药物干预浓度。研究共设置了低糖组、高糖组、米诺环素组、益景汤组4组体外iBRB模型,其中低糖组予25 mmol/L葡萄糖干预,高糖组予60 mmol/L葡萄糖干预,米诺环素组予60 mmol/L葡萄糖+10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 米诺环素干预,益景汤组予60 mmol/L葡萄糖+10%益景汤含药血清干预。各组干预12 h后终止孵育备检。

1.2.4 蛋白免疫印迹法检测相关蛋白的表达 在iBRB模型培养第16 h时,弃表面旧培养基液,按组别更换含对应

干预条件的培养基液,干预 12 h。收集各组细胞,按试剂说明书加入细胞裂解液,混匀冰上静置裂解,离心、定量,制备蛋白样品。用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,经转膜、封闭后,行对应抗体的孵育,显影。采用 Image J (Image J 1.8.0; National Institutes of Health, MD, 美国)进行条带光密度值分析,获取目的蛋白 CIV、LN、MMP-2、MMP-3、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 的相对表达量。

统计学分析:采用开源统计软件 JASP (V0.14.1) 进行数据处理,采用单因素方差分析进行检验,进一步的两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 益景汤对 iBRB 模型 CIV 及 LN 蛋白表达的影响 高糖能够诱导 iBRB 模型 CIV 蛋白表达的增加。与低糖组 (0.053 ± 0.006) 相比,高糖组 (0.174 ± 0.007)、米诺环素组 (0.111 ± 0.021)、益景汤组 (0.102 ± 0.029) CIV 蛋白表达上升,差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。益景汤及米诺环素能够抑制高糖诱导的 CIV 蛋白表达增加,益景汤组、米诺环素组与高糖组相比差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。益景汤组与米诺环素组 CIV 蛋白表达相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。高糖能够诱导 iBRB 模型 LN 蛋白表达的增加。与低糖组 (0.046 ± 0.017) 相比,高糖组 (0.173 ± 0.028)、米诺环素组 (0.100 ± 0.034) LN 蛋白表达增加,差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。益景汤 (0.091 ± 0.030) 及米诺环素能够抑制高糖诱导的 LN 蛋白表达增加,益景汤组、米诺环素组与高糖组相比差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。益景汤组与米诺环素组、低糖组相比差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$),见图 1。

2.2 益景汤对 iBRB 模型 MMPs/TIMPs 蛋白表达的影响

高糖能够诱导 iBRB 模型 MMP-2、MMP-3、MMP-9 蛋白表达增加。与低糖组 (MMP-2: 0.049 ± 0.015 , MMP-3: 0.079 ± 0.030 , MMP-9: 0.099 ± 0.011) 相比,高糖组 (MMP-2: 0.219 ± 0.042 , MMP-3: 0.199 ± 0.049 , MMP-9: 0.244 ± 0.091)、米诺环素组 (MMP-2: 0.181 ± 0.038 , MMP-3: 0.181 ± 0.030 , MMP-9: 0.227 ± 0.071) MMP-2、MMP-3、MMP-9 蛋白表达上升,差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。益景汤能够抑制高糖诱导的 MMP-2、MMP-3、MMP-9 蛋白表达增加,益景汤组 (MMP-2: 0.100 ± 0.016 , MMP-3: 0.118 ± 0.008 , MMP-9: 0.117 ± 0.010) 与高糖组、米诺环素组相比差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$),见图 2A-C、F。低糖组 (TIMP-1: 0.250 ± 0.107 , TIMP-2: 0.167 ± 0.032)、高糖组 (TIMP-1: 0.203 ± 0.044 , TIMP-2: 0.166 ± 0.058)、米诺环素组 (TIMP-1: 0.164 ± 0.023 、

TIMP-2: 0.151 ± 0.036)、益景汤组 (TIMP-1: 0.164 ± 0.046 , TIMP-2: 0.174 ± 0.039) 各组之间 TIMP-1、TIMP-2 表达未见明显差异 (均 $P > 0.05$),见图 2D-F。

3 讨论

iBRB 由 RMPs、ECs 和其分泌形成的 BM 及细胞间的连接构成。iBRB 具有屏障功能,可以调控视网膜微循环。在生理状态下,血管内液体和离子可进入视网膜,而血细胞及蛋白质等大分子物质则难以进入^[8]。iBRB 结构完整性破坏及随之发生的微血管渗透性增加等病理变化是 DR 发生、发展的重要基础。这些病理变化在视网膜上直接表现为 ECs 增殖异常、RMPs 丢失、BM 增厚重塑及视网膜血流动力学变化等。这些表现发生于 DR 早期,甚至早于肉眼可见的视网膜病变^[9]。其中视网膜微血管 BM 重塑、增厚是早期 DR 特征性表现之一。因此,探讨早期 DR 微血管 BM 损害的病理机制,有助于 DR 早期防控。

BM 是一种特化结构形式的细胞外基质,组成成分主要为胶原蛋白和非胶原蛋白,由 RMPs 和 ECs 合成释放形成并包绕在 RMPs 和 ECs 周围,具有细胞黏附、分化、迁移和细胞表型维持等多种功能^[10]。CIV 和 LN 是 BM 主要的组成蛋白,其中 CIV 是 BM 的核心胶原成分,LN 则广泛分布于 BM 的透明层,二者结合形成 BM 的骨架,对 RMPs 和 ECs 等细胞的黏附、运动、生长具有重大的影响^[11],对维持视网膜毛细血管的选择性通透性及微血管系统内外层之间的稳态平衡具有重要作用^[12]。

BM 的损害主要归因于相关蛋白合成与降解的失衡。合成增加表现为 CIV、LN 等蛋白的异常沉积^[11]。这些改变可阻碍 ECs 与 RMPs 细胞间正常通讯及生长因子的接受,影响微血管壁的完整性和功能^[13],并诱导视网膜微血管 BM 异常降解增加。合成和降解异常致使 BM 重塑、结构紊乱,进一步导致 ECs 游走形成新生血管。本研究发现高糖可以促进体外血管新生模型 CIV、LN 蛋白的合成,表明高糖诱导了 DR 的 BM 病理重塑,与既往动物研究结果一致^[14]。

BM 的降解受 MMPs 和其特异性抑制剂 TIMPs 复合体的调控。MMPs 存在于细胞核、线粒体和细胞质内,是一组 Zn 离子依赖的结构和功能同源的内肽酶家族,目前已分离鉴别出 28 个成员 (MMP1-28)。MMPs 能够降解细胞外基质多种蛋白成分^[15],如 CIV 和 LN 等;TIMPs 能与 MMPs 以共价键的形式相结合成 1:1 复合体,特异性抑制 MMPs 的活性。正常情况下,MMPs 和 TIMPs 相互作用,使 BM 降解处于动态平衡中,MMPs 活性增强或 TIMPs 活性降低都会破坏 BM 的动态平衡,造成 BM 异常降解。

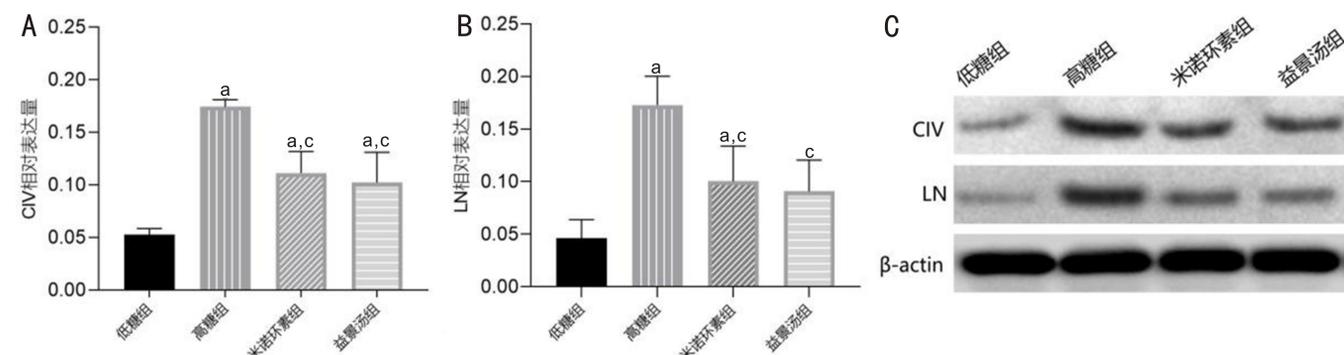


图 1 各组 CIV 和 LN 蛋白的表达 A: CIV; B: LN; C: 各组对应的蛋白条带。每组样本量 $n = 3$, $^a P < 0.05$ vs 低糖组; $^c P < 0.05$ vs 高糖组。

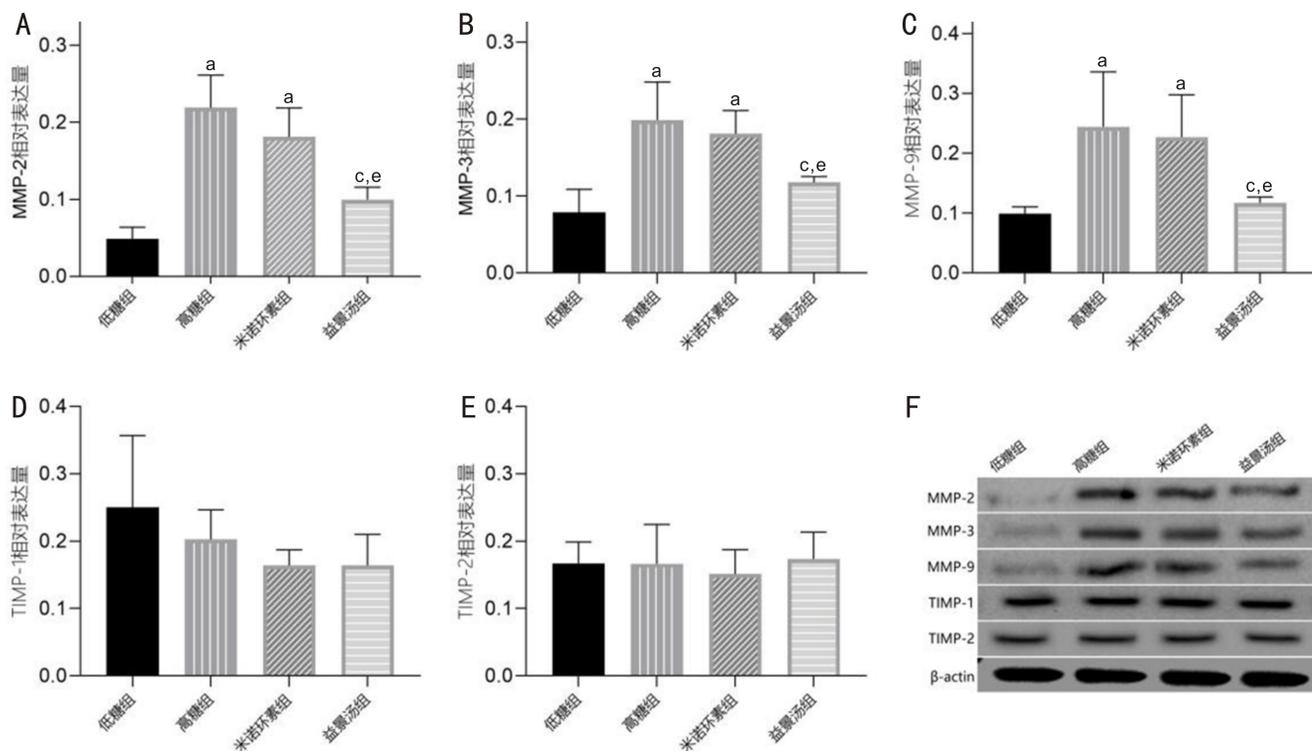


图2 各组基质金属蛋白酶及其抑制剂的表达 A: MMP-2; B: MMP-3; C: MMP-9; D: TIMP-1; E: TIMP-2; F: 各组对应的蛋白条带。每组样本量 $n=3$, ^a $P<0.05$ vs 低糖组; ^c $P<0.05$ vs 高糖组; ^e $P<0.05$ vs 米诺环素组。

在细胞外基质的代谢平衡中, MMP-2 和 TIMP-2 起着至关重要的作用。TIMP-2 特异性抑制 MMP-2 的胶原及明胶分解活性。MMP-9 和 MMP-2 一样同属明胶酶, 也是 BM 主要降解、重塑酶之一, 对 ECs 游走形成新生血管起重要作用^[16]。MMP-3 激活后不仅能广泛降解细胞外基质, 也可以降解完整的基底膜 C IV, 并能激活其他 MMPs 参与到细胞外基质的降解过程中^[17]。TIMP-1 作为 MMP-3 和 MMP-9 的抑制剂, 特异性抑制 MMP-3 和 MMP-9 的活性。已有大量研究表明 MMPs 与 DR 等 DM 微血管并发症相关, 特别在伴有视网膜新生血管的增殖性 DR 中^[16,18]。对于非增殖性的早期 DR, 在动物模型研究中发现, 早期 DR 视网膜血管周围 MMP-2 的表达及活性较正常对照组明显增强^[19]; 临床研究表明, 早期 DR 患者外周血 MMP-9 水平高于正常对照组^[20], DME 患者房水中 MMP-9 水平高于正常对照组^[18]。本研究发现, 尽管高糖对体外血管新生模型中 TIMP-1、TIMP-2 影响较弱, 但可以促进其 MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 蛋白的合成, 影响 MMPs 与 TIMPs 比例平衡, 参与了 BM 的重塑。

益景汤是福建省名老中医金威尔教授结合多年临床经验总结出的用于防治 DR 的有效经验方。DR 多发生在 DM 病程 5 a 以上, 金教授认为消渴日久则耗气伤津, 阴虚津少则不载血, 气虚乏力则血不行, 故 DR 病机多为气阴两虚夹瘀, 在治疗上需注重益气、养阴、化瘀^[21]。益景汤以补阳还五汤为基础, 加入了养阴之品, 具有益气养阴、活血明目之效。前期临床研究^[2-3,22]证实益景汤治疗 DR 效果好, 能够在一定程度上改善 DR 患者 iBRB 功能及视网膜微循环。基础研究发现益景汤够抑制 DM 大鼠 RMPs 的凋亡^[23], 缓解视网膜毛细血管床减少, 改善视网膜血供, 减轻视网膜微血管渗漏^[24-25]。本次研究在既往研究基础上, 探讨了益景汤干预早期 DR 微血管 BM 损害的机制。研究发现益景汤能降低高糖诱导的 C IV、LN、

MMP-2、MMP-3、MMP-9 蛋白表达, 表明益景汤能够通过调控 MMPs/TIMPs 相关分子表达, 干预高糖状态下 BM 的重塑, 抑制 BM 的损害, 保护 iBRB。

在本次研究中, 我们还关注到阳性对照组——米诺环素组与益景汤组的结果存在差异。米诺环素是 MMPs 的抑制剂, 其结构中含有络合 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子的位点, 从而可以与 MMPs 相结合, 影响组织中 MMPs 的活性, 并调控下游相关因子进而影响 iBRB 功能。既往研究表明米诺环素对 DM 大鼠 iBRB 有一定的保护作用^[26-27]。因此在本次研究中, 米诺环素被用于阳性对照组。但是, 米诺环素本身并不影响 MMPs/TIMP 上游调控基因, 不影响 MMPs 蛋白量的表达, 仅干预 MMPs 的活性, 并进而影响下游部分因子的表达。本次研究结果与之原理相符——在本次研究中, 米诺环素组 MMP-2、MMP-3、MMP-9 亦受高糖诱导增加, MMPs 相关蛋白表达与高糖组差异无统计学意义, 仅下游 C IV、LN 蛋白表达较高糖组降低。这也提示益景汤干预 iBRB 损害的机制与米诺环素组存在差异。

本次研究在技术手段、宽度、深度存在一定的不足, 仅从 MMPs/TIMP 蛋白 TIMP-1、TIMP-2、MMP-2、MMP-3、MMP-9 表达量及其下游 BM 结构蛋白 C IV、LN 表达量角度探讨了益景汤干预早期 DR 的作用机制, 未来可以从整个 MMPs/TIMP 信号通路入手, 结合体外研究、体内研究和临床研究, 采用多种实验技术手段进行验证, 以改善研究的宽度和深度。

综上所述, 调控 MMP-2、MMP-3、MMP-9、C IV、LN 的表达, 干预高糖诱导的 BM 重塑, 抑制 BM 的损害, 可能是益景汤干预 DR 的作用机制之一, 但是益景汤通过上游何种机制对 MMPs/TIMP 相关分子进行调控仍然有待进一步研究。

参考文献

- [1] Roach T, Alcendor DJ. Zika virus infection of cellular components of the blood-retinal barriers; implications for viral associated congenital ocular disease. *J Neuroinflammation*, 2017,14(1):43.
- [2] 刘光辉, 江蕊, 徐朝阳, 等. 加味补阳还五汤治疗糖尿病黄斑水肿 20 例疗效观察. *福建中医药*, 2011,42(1):22-23.
- [3] 林颖, 朱锐, 陈文祥. 益气养阴活血法治疗糖尿病性视网膜病变 40 例临床观察. *福建中医学院学报*, 2009,19(3):1-3.
- [4] 刘光辉, 张云辉, 郑永征, 等. 益景汤对糖尿病大鼠血-视网膜屏障的影响. *中国中医眼科杂志*, 2021,31(12):851-855.
- [5] 胡健艳, 吴强, 宋蓓雯, 等. 大鼠视网膜微血管内皮细胞的原代培养及鉴定改进. *眼科*, 2012,21(4):261-263.
- [6] Liu GH, Meng C, Pan MD, et al. Isolation, purification, and cultivation of primary retinal microvascular pericytes; a novel model using rats. *Microcirculation*, 2014,21(6):478-489.
- [7] 刘光辉, 杨田野, 洪雅军, 等. 基于内皮细胞/周细胞构建大鼠视网膜血管新生体外三维模型. *国际眼科杂志*, 2021, 21(9):1520-1523.
- [8] Cunha-Vaz JBRLC. Blood-Retinal Barrier. *Europ J Ophthalmol*, 2011,21(6):3-9.
- [9] Leal EC, Martins J, Voabil P, et al. Calcium dobesilate inhibits the alterations in tight junction proteins and leukocyte adhesion to retinal endothelial cells induced by diabetes. *Diabetes*, 2010, 59(10):2637-2645.
- [10] Domogatskaya A, Rodin S, Tryggvason K. Functional diversity of laminins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012,28:523-553.
- [11] Roy S, Kim D. Retinal capillary basement membrane thickening: Role in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*, 2021,82:100903.
- [12] Jayadev R, Sherwood DR. Basement membranes. *Curr Biol*, 2017, 27(6):R207-R211.
- [13] Durham JT, Herman IM. Microvascular modifications in diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rep*, 2011,11(4):253-264.
- [14] 刘学政, 萧鸿, 庞东渤, 等. 糖尿病早期大鼠视网膜毛细血管及视细胞超微结构变化规律. *解剖学杂志*, 2001,24(4):331-335.
- [15] Rose-John S. Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018,10(2):a028415.
- [16] Kowluru RA, Zhong Q, Santos JM. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012,21(6):797-805.
- [17] 杨晶晶, 何湘珍. 基质金属蛋白酶与眼科疾病的研究进展. *国际眼科杂志*, 2011,11(7):1185-1187.
- [18] Abu El-Asrar AM, Mohammad G, Nawaz MI, et al. Relationship between vitreous levels of matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *PLoS One*, 2013,8(12):e85857.
- [19] Yang R, Liu HB, Williams I, et al. Matrix metalloproteinase-2 expression and apoptogenic activity in retinal pericytes: implications in diabetic retinopathy. *Ann N Y Acad Sci*, 2007,1103:196-201.
- [20] Jacqueminet S, Ben Abdesselam O, Chapman MJ, et al. Elevated circulating levels of matrix metalloproteinase-9 in type 1 diabetic patients with and without retinopathy. *Clin Chim Acta*, 2006, 367(1-2):103-107.
- [21] 金威尔, 刘安, 魏富强. 中药联合视网膜光凝治疗糖尿病视网膜病变的疗效观察. *中国中医眼科杂志*, 2007,17(4):233-235.
- [22] 曹明芳, 金威尔, 张文贤, 等. 益景汤加减联合激光治疗气阴两虚夹瘀型消渴目病的临床研究. *山西中医学院学报*, 2016,17(4):40-42,45.
- [23] 刘光辉, 刘安, 郑永征, 等. 加味补阳还五汤对糖尿病大鼠视网膜微血管周细胞凋亡的影响. *北京中医药大学学报*, 2013,36(3):178-182.
- [24] 郑永征, 谢茂松, 刘光辉, 等. 加味补阳还五汤对糖尿病大鼠视网膜血流动力学的影响. *山西中医学院学报*, 2013,14(2):24-27.
- [25] 郑永征, 谢茂松, 刘光辉, 等. 加味补阳还五汤对糖尿病大鼠视网膜血管的影响. *福建医科大学学报*, 2013,47(1):34-38.
- [26] 何玲, 余昌胤, 杨小艳. 米诺环素对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞 NF- κ B 活性的影响. *中国现代医学杂志*, 2013,23(23):26-31.
- [27] 庞燕. 米诺环素对糖尿病大鼠视网膜病变抑制作用的研究. *四川大学*, 2006:48,80.