

视网膜色素上皮细胞间紧密连接及其在 AMD 发病过程中的作用研究进展

王巧云, 解来青

引用:王巧云, 解来青. 视网膜色素上皮细胞间紧密连接及其在 AMD 发病过程中的作用研究进展. 国际眼科杂志 2023; 23(2): 232-235

基金项目:江苏省卫生健康委医学科科研项目(No.M2020053); 苏州市医疗卫生科技创新(应用基础研究)(No.SKJY2021083)

作者单位:(215004)中国江苏省苏州市,苏州大学附属第二医院眼科

作者简介:王巧云,苏州大学在读硕士研究生,研究方向:白内障、眼底病、眼外伤。

通讯作者:解来青,毕业于苏州大学,博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:白内障、眼底病、眼外伤. xielaiqing123@163.com

收稿日期:2022-05-06 修回日期:2023-01-04

摘要

年龄相关性黄斑变性(AMD)是引起老年人群不可逆性视力损害的常见眼病。视网膜色素上皮细胞(RPEs)间紧密连接(TJ)是血-视网膜外屏障(oBRB)的重要结构单元。紧密连接在AMD的发病过程中有所缺陷,进而促进oBRB的破坏,加速AMD的发生和进展。本文将对紧密连接与紧密连接蛋白在维持oBRB功能、紧密连接蛋白异常与oBRB破坏在AMD发病过程中的作用研究进行综述,以期对AMD治疗的研究提供新的思路。

关键词:年龄相关性黄斑变性(AMD);血-视网膜外屏障;视网膜色素上皮;紧密连接

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.2.10

Research progress of tight junction between retinal pigment epithelium cells and its disruption in the pathogenesis of age-related macular degeneration

Qiao-Yun Wang, Lai-Qing Xie

Foundation items: Medical Scientific Research Project of Jiangsu Provincial Health Commission (No. M2020053); Medical and Health Science and Technology Innovation of Suzhou (Applied Basic Research) (No. SKJY2021083)

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Lai-Qing Xie. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China. xielaiqing123@163.com

Received:2022-05-06 Accepted:2023-01-04

Abstract

• Age-related macular degeneration (AMD) is a common

eye disease causing irreversible visual impairment in the elderly. The tight junction (TJ) between retinal pigment epithelium cells (RPEs) is an important structural unit of the outer blood retinal barrier (oBRB). The TJ is defective in the pathogenesis of AMD, which in turn promotes the destruction of oBRB and accelerates the occurrence and progression of AMD. In this paper, the roles of TJ and TJ protein in maintaining oBRB function, TJ protein abnormality and oBRB destruction in the pathogenesis of AMD were reviewed, aiming to provide new ideas for the treatment of AMD.

• **KEYWORDS:** age - related macular degeneration (AMD); outer blood retinal barrier; retinal pigment epithelium; tight junction

Citation: Wang QY, Xie LQ. Research progress of tight junction between retinal pigment epithelium cells and its disruption in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(2):232-235

0 引言

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是一种视网膜的退行性疾病,病变主要累及黄斑区域,进而造成中心视野缺失和视力下降,是全球老年人群不可逆视力损伤的首要原因^[1]。根据其典型的临床和病理特点,AMD可分为干性(非渗出型或萎缩型)AMD和湿性(渗出型或新生血管型)AMD。干性AMD主要表现为眼底散在分布的玻璃膜疣,并逐渐引起黄斑萎缩。湿性AMD主要表现为脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV),从而引发眼底出血、渗出,晚期亦可发展为萎缩病灶^[2]。在AMD的发展进程中,血-视网膜内、外屏障均有不同程度损坏,其中血-视网膜外屏障(outer blood retinal barrier, oBRB)的破坏发生在疾病晚期^[3]。oBRB主要由视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium cells, RPEs)、Bruch膜以及脉络膜毛细血管的内皮细胞构成,其中RPEs间的紧密连接(tight junction, TJ)是确保oBRB屏障功能的最主要部分。在结构上,紧密连接由三个部分组成:(1)整合跨膜蛋白,如闭合蛋白(Occludin)、密封蛋白(Claudin)和连接黏附分子(junctional adhesion molecule, JAM);(2)外周锚定蛋白,如ZO蛋白家族紧密连接蛋白1(tight junction protein 1, ZO-1);(3)紧密连接相关调控蛋白^[4]。紧密连接蛋白的缺陷在AMD发病进程中发挥着至关重要的作用^[5]。目前临床上对于干性AMD缺乏特效的治疗方法,对于湿性AMD主要是将抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)药物注射到玻璃体腔内,以减少CNV的生长和渗出^[6],但该方法存在需重复注射、并最终无法

逆转黄斑区纤维化瘢痕结局的缺点。因此,本文将对紧密连接在 oBRB 功能的维持、紧密连接蛋白异常与 oBRB 的破坏在 AMD 发病过程中的作用等相关研究进行综述,以期对 AMD 治疗的研究提供新的思路。

1 紧密连接与 oBRB

1.1 紧密连接与紧密连接蛋白 紧密连接属细胞间连接的一种,后者还包括黏附连接、缝隙连接和桥粒连接。上皮细胞间和内皮细胞间的连接复合体主要由紧密连接构成,紧密连接使相邻的两个或两个以上细胞的细胞膜紧密的连接起来,以便封闭细胞间隙,形成细胞膜内外屏障,如 oBRB^[7]。在功能上,紧密连接蛋白主要起连接作用,其在肌动蛋白纤维上,形成连接膜和细胞骨架之间的桥梁。紧密连接对溶质和水的扩散形成了屏障,这被称为屏障功能。此外其对基底外侧和顶端质膜之间细胞极性的维持也形成了屏障,这被称为栅栏功能^[8]。在物质运输和信号传导方面,紧密连接也发挥了重要作用,以便调节细胞的生长、增殖和分化^[9]。生理状态下,细胞间连接始终保持动态平衡。在连接成熟和稳定过程中,跨膜蛋白的细胞内分布也会发生变化。即使在质膜和细胞质之间形成稳定的接触并持续循环之后,连接仍处于动态平衡状态^[10]。

1.2 RPECs 间紧密连接与 oBRB 血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)分为血-视网膜内屏障(inner blood-retinal barrier, iBRB)和 oBRB^[11-12]。iBRB 由视网膜毛细血管内皮细胞及包裹内皮细胞的周细胞和 Müller 细胞构成,Müller 细胞通过信号传递的方式感知视网膜微环境进而影响视网膜毛细血管内皮细胞的活动。oBRB 由 RPECs 之间的紧密连接、Bruch 膜以及脉络膜毛细血管的内皮细胞构成。视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)位于光感受器(photoreceptor, PR)与 Bruch 膜之间,将感光的视网膜与能量供应的脉络膜毛细血管隔开。紧密连接连接相邻的 RPECs,阻止血浆成分和有毒分子进入视网膜,并允许液体和溶质以一定的渗透梯度从脉络膜血管系统流向视网膜外层^[13]。此外,RPE 还具有维持散射光的吸收、旁分泌(如分泌 VEGF)、视网膜下间隙平衡等重要生理功能。因此,RPE 的主动转运和 RPECs 间的紧密连接共同维持诸如视网膜-脉络膜营养物质的过滤和运输、视网膜代谢废物的清理和排泄、以及参与对光感受器外段(photoreceptor outer segment, POS)的吞噬作用,进而维持 PR 的正常生理功能^[14]。

1.3 紧密连接蛋白与 oBRB 的关系

1.3.1 ZO-1 与 oBRB 的关系 ZO 蛋白属膜相关鸟苷酸激酶家族(membrane associated guanylate kinase, MAGUK),包括 ZO-1、ZO-2 和 ZO-3 三个亚型。其中 ZO-1 是在上皮和内皮细胞中发现的第一个紧密连接蛋白^[13]。ZO-1 与一些紧密连接跨膜蛋白结合,并与肌动蛋白丝连接,从而维持细胞动力^[15]。ZO-1/ZO-1-相关核酸结合蛋白(ZO-1-associated nucleic acid-binding protein, ZONAB)信号通路控制上皮细胞在 G1/S 期转变和分化^[16]。Georgiadis 等^[17]研究表明,ZONAB 的激活是 RPECs 中 ZO-1 表达缺失的主要原因。下调 ZO-1 后可观察到 RPE 单层分子膜的固缩和破裂、POS 固有的规则排列变的紊乱,并伴有细胞外间隙的形成,进而造成 RPE 屏障功能的破坏。Farjood 等^[18]研究显示,在人 RPE 长期培养中,ZO-1 定位于根尖和细胞间区域,VEGF 主要表达于基底外侧,ZO-1 的表达水平和 VEGF 的表达量成反比。

在干性 AMD 的后期,RPECs 的凋亡导致其细胞间紧密连接的丧失,ZO-1 表达下调,VEGF 表达升高,进而促进 CNV 的形成。在对干性 AMD 向湿性 AMD 转变的病理分析中发现,CNV 始于干性 AMD 的外周边缘,这也间接证明 RPECs 间紧密连接的破坏在干性 AMD 向湿性 AMD 的转变中发挥了重要作用。

1.3.2 Occludin 与 oBRB 的关系 Occludin 属紧密连接相关的 Marvel 蛋白(TJ-associated Marvel protein, TAMP)家族,是最早发现的与紧密连接相关的跨膜蛋白,其具有四个跨膜结构域^[19]。Occludin 优先定位于双细胞紧密连接中,参与细胞黏附和调节细胞旁通透性。其 C 端与 ZO-1 和 ZO-2 相互作用,最后 150 个氨基酸与肌动蛋白丝相互作用。新近研究发现,Occludin 的翻译后磷酸化状态影响其在紧密连接中的位置及其对细胞外通透性的调节功能^[12]。Occludin 的苏氨酸和丝氨酸磷酸化与紧密连接完整性保持一致,而 Occludin 的酪氨酸磷酸化会破坏 ZO-1 和 Occludin 的结合,进而增加细胞旁通透性。在生理状态下,Occludin 主要通过与 ZO-1 的相互作用来维持正常的 RPECs 间紧密连接^[20]。Zhang 等^[21]研究发现,在实验性糖尿病视网膜病变模型中,oBRB 的严重损伤是大鼠视网膜水肿的主要因素。促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)通过下调低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)和 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路,进而上调 RPECs 中 ZO-1 和 occludin 的表达,维持 oBRB 的完整性。在 AMD 发病过程中也存在 Occludin 与 ZO-1 结合体的破坏,Jo 等^[5]研究提出,细胞内淀粉样蛋白- β 通过活化 B 细胞的核因子 κ 轻链增强子(nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells, NF- κ B)的活化,破坏 Occludin 与 ZO-1 复合物的完整性,进而促进 AMD 的疾病进展。Fabian 等^[22]新近报道,采用高渗和氧化应激破坏 Occludin 与 ZO-1 的连接可使脉络膜微环境中 VEGF 表达上调,而采用对 Occludin 与 ZO-1 连接的保护剂垂体腺苷酸环化酶活化多肽(pituitary adenylate cyclase activated polypeptide, PACAP)后,脉络膜中 VEGF 的表达出现下调,进而实验组小鼠黄斑区 CNV 的形成得到了有效抑制。上述研究为 Occludin 蛋白保护剂应用于 AMD 等新生血管性眼病的治疗提供了新的启示。

1.3.3 Claudin 与 oBRB 的关系 与 Occludin 相似,Claudin 也有四个跨膜区域(两个胞外域和两个胞内域),其通过 C 端结构域直接与 ZO-1、ZO-2 和 ZO-3 等外周蛋白相互作用。Claudin 的第一个胞外区决定跨上皮细胞膜电阻(trans epithelial electric resistance, TEER)和胞外电荷选择性,从而维持细胞间的通透性^[13]。上皮细胞间的紧密连接可维持溶质和水在上皮细胞间的跨上皮运动,即细胞旁渗透性。细胞旁渗透性有孔隙途径和渗漏途径两种途径,前者介导小离子和溶质运动,后者介导大溶质运动^[19]。Claudin 蛋白形成基本的细胞旁渗透性屏障,并通过孔隙途径介导小离子和溶质运动,对细胞旁选择性和通透性发挥着独特的功能。Claudin 有多种分型,在不同物种和不同组织表型各异。其中 Claudin-19 在 RPE 中表达且含量丰富,是目前最主要的 Claudin^[23]。Wang 等^[24]近期研究表明,突变 Claudin-19 可影响 RPE 发育的各个阶段,并对视网膜分化存在重要影响。

1.3.4 JAM 与 oBRB 的关系 JAM 是免疫球蛋白超家族

(immunoglobulin superfamily, IgSF)中 CTX 亚家族的成员,包括 JAM-A、JAM-B、JAM-C 和 JAM4^[25]。已知 JAM 可与诸多蛋白质相互作用,并通过靶向紧密连接相关的蛋白质来调节紧密连接的功能。JAM 由一个跨膜区和一个包含两个 Ig 样基序的胞外区组成。C 端结构域参与紧密连接支架蛋白的相互作用,这对维持紧密连接的正常功能尤为重要。JAM-A 可与 Occludin、ZO-1 共定位,进而维持正常的紧密连接^[13]。Jia 等^[26]研究表明,JAM-C 在成年小鼠视网膜和脉络膜中大量表达,在体外培养的 RPECs 和 PR 细胞中亦有所表达。过氧化氢(H₂O₂)诱导的氧化应激可下调 JAM-C 的表达,扰乱其膜定位,进而影响 oBRB 的正常功能。JAM-C 在视网膜毛细血管内皮细胞中过表达或敲除分别降低或增加胞质 Ca²⁺浓度,进而影响 JAM-C 的动态易位,造成 BRB 的功能障碍。调节 JAM-C 活性对 BRB 功能障碍相关眼病的治疗具有潜在的治疗价值^[27]。

2 紧密连接及 oBRB 破坏与 AMD

AMD 的相关研究提示,AMD 的发生及进展与 RPECs 间紧密连接的破坏密切相关。在氧化应激、缺氧、炎症等病理条件下,RPE 退化,视锥细胞凋亡,最终形成以黄斑区地图样萎缩为特征的干性 AMD 的晚期形态。在 RPE 的退化过程中,RPECs 间紧密连接破坏(早于或晚于 RPE 退化,有待进一步研究)、紧密连接相关蛋白如 ZO-1、Occludin、Claudin、JAM 及 VEGF 的表达和分布发生异常,oBRB 正常生理屏障功能遭到破坏,CNV 形成并跨越 RPE 侵入神经上皮层下间隙,进而促进 AMD 由干性转变为湿性,局部微环境的改变会引起 RPECs 间紧密连接的进一步破坏,从而导致黄斑功能的严重损坏^[3]。

RPECs 的微绒毛从其顶面延伸至视杆细胞和视锥细胞的外节,从而构成 RPECs 和 PR 细胞之间独特的功能单元,这被认为是维持视觉功能的关键^[28]。在干性 AMD 中,中央凹周围的 RPE 首先退化,随着病程进展,RPE 退化逐渐向中央凹发展,最终导致中央凹视锥细胞凋亡和中心视力丧失。每个中央凹 RPECs 都支持其对应部位视锥细胞的营养代谢。最低限度的 RPE 再生,甚至维持现有的 RPE 而不进一步退化,可保证足够的 PR 存活,从而保证患者的中心视力和生活质量^[29]。RPE 变性、玻璃膜疣形成或与衰老相关的凋亡可导致 RPECs 间紧密连接的丢失,进而引起 RPE 的上述功能发生障碍^[30]。在湿性 AMD 中,CNV 形成是其主要病理机制,VEGF 是 CNV 形成的始动因素。VEGF 除脉络膜自分泌外^[31],亦可由健康 RPECs 的基底外侧分泌。生理条件下,适度 VEGF 的分泌参与脉络膜血管的调节^[32],而 RPE 退化引起的 RPECs 间的紧密连接破坏可诱导 VEGF 的过度表达,从而引发 CNV,最终造成 AMD 由干性转变为湿性^[33]。Warden 等^[34]通过对 TEER 和 ZO-1 的免疫荧光检测发现,100~500 μmol/L 浓度的甘氨酸和甘氨酸熊脱氧胆酸可有效保护 RPECs 间紧密连接免受氧化应激损伤,且可抑制 VEGF 介导的 CNV 形成及其迁移,为湿性 AMD 的治疗开辟了新的方向。上述研究表明,RPE 破坏可引起紧密连接衰减或分布改变,进而通过 VEGF 上调改变 AMD 的进程^[35],而阻止或减缓 RPECs 间紧密连接的破坏,对阻止 AMD 的进展具有重要意义。

3 总结与展望

AMD 引发的 CNV 部分由于干性 AMD 期 RPE 的退化导

致 VEGF 的过度表达所介导,探索 oBRB 屏障破坏的时期和机制对阻断 VEGF 过度表达有一定的指导意义。多种遗传因素、氧化应激、脂质代谢、炎症、外伤和衰老相关的凋亡等可造成黄斑区视网膜缺血缺氧,大量脂质代谢产物不能及时被清理从而形成以玻璃膜疣为特征的干性 AMD 的典型病理改变。当病情进展时,RPECs 间紧密连接被破坏,VEGF 过表达,CNV 形成,CNV 突破 oBRB 并向神经视网膜下间隙生长,从而使疾病进入到以黄斑区 CNV 形成和出血为特征的湿性 AMD 的更加严重的阶段。RPE 相关紧密连接蛋白在湿性 AMD 的发病过程中的具体作用机制有待进一步深入的探讨。尽管已证实 oBRB 细胞间紧密连接缺陷与 AMD 引发的 CNV 有关,但紧密连接缺陷最初发生的时间点、始动因素及紧密连接相关蛋白改变的上、下游调控通路在 AMD 发生发展过程中的作用仍存诸多疑问。深入探究紧密连接缺陷与 AMD 的关系及其机制或许可为 AMD 相关新生血管性眼病的治疗提供新的思路。

参考文献

- 1 Deng YH, Qiao LF, Du MY, et al. Age-related macular degeneration: Epidemiology, genetics, pathophysiology, diagnosis, and targeted therapy. *Genes Dis* 2022;9(1):62-79
- 2 Markowitz SN, Devenyi RG, Munk MR, et al. A double-masked, randomized, sham-controlled, single-center study with photobiomodulation for the treatment of dry age-related macular degeneration. *Retina* 2020;40(8):1471-1482
- 3 Fleckenstein M, Mitchell P, Freund KB, et al. The progression of geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2018;125(3):369-390
- 4 Piontek J, Krug SM, Protze J, et al. Molecular architecture and assembly of the tight junction backbone. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2020;1862(7):183279
- 5 Jo DH, Cho CS, Kim JH, et al. Intracellular amyloid-β disrupts tight junctions of the retinal pigment epithelium via NF-κB activation. *Neurobiol Aging* 2020;95:115-122
- 6 Fleckenstein M, Keenan TDL, Guymer RH, et al. Age-related macular degeneration. *Nat Rev Dis Primers* 2021;7(1):31
- 7 Bhat AA, Syed N, Therachiyil L, et al. Claudin-1, A double-edged sword in cancer. *Int J Mol Sci* 2020;21(2):569
- 8 Zihni C, Mills C, Matter K, et al. Tight junctions; from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016;17(9):564-580
- 9 Otani T, Furuse M. Tight junction structure and function revisited. *Trends Cell Biol* 2020;30(10):805-817
- 10 Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, et al. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem* 2000;275(27):20520-20526
- 11 Hosoya K, Tachikawa M. The inner blood-retinal barrier: molecular structure and transport biology. *Adv Exp Med Biol* 2012;763:85-104
- 12 Rudraraju M, Narayanan SP, Somanath PR. Regulation of blood-retinal barrier cell-junctions in diabetic retinopathy. *Pharmacol Res* 2020;161:105115
- 13 O'Leary F, Campbell M. The blood-retina barrier in health and disease. *FEBS J* 2021[Epub ahead of print]
- 14 Naylor A, Hopkins A, Hudson N, et al. Tight junctions of the outer blood retina barrier. *Int J Mol Sci* 2019;21(1):211
- 15 Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, et al. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998;273(45):29745-29753
- 16 Sourisseau T, Georgiadis A, Tsapara A, et al. Regulation of PCNA

and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Mol Cell Biol* 2006;26(6):2387-2398

17 Georgiadis A, Tschernutter M, Bainbridge JW, et al. The tight junction associated signalling proteins ZO-1 and ZONAB regulate retinal pigment epithelium homeostasis in mice. *PLoS One* 2010;5(12):e15730

18 Farjood F, Vargis E. Physical disruption of cell-cell contact induces VEGF expression in RPE cells. *Mol Vis* 2017;23:431-446

19 Monaco A, Ovrin B, Axis J, et al. The epithelial cell leak pathway. *Int J Mol Sci* 2021;22(14):7677

20 Bewley MC, Tash BR, Tian F, et al. A complex affair: attraction and repulsion make occludin and ZO-1 function!. *Tissue Barriers* 2013;1(1):e23496

21 Zhang CY, Xie H, Yang Q, et al. Erythropoietin protects outer blood-retinal barrier in experimental diabetic retinopathy by up-regulating ZO-1 and occludin. *Clin Exp Ophthalmol* 2019;47(9):1182-1197

22 Fabian E, Reglodi D, Horvath G, et al. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide acts against neovascularization in retinal pigment epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 2019;1455(1):160-172

23 Peng SM, Rao VS, Adelman RA, et al. Claudin-19 and the barrier properties of the human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(3):1392-1403

24 Wang SB, Xu T, Peng SM, et al. Disease-associated mutations of claudin-19 disrupt retinal neurogenesis and visual function. *Commun Biol* 2019;2:113

25 Ebnet K. Junctional adhesion molecules (JAMs): cell adhesion receptors with pleiotropic functions in cell physiology and development. *Physiol Rev* 2017;97(4):1529-1554

26 Jia X, Zhao C, Chen QS, et al. JAM-C maintains VEGFR2 expression to promote retinal pigment epithelium cell survival under oxidative stress.

Thromb Haemost 2017;117(4):750-757

27 Hou X, Du HJ, Zhou J, et al. Role of junctional adhesion molecule-C in the regulation of inner endothelial blood-retinal barrier function. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:695657

28 Somasundaran S, Constable IJ, Mellough CB, et al. Retinal pigment epithelium and age-related macular degeneration: a review of major disease mechanisms. *Clin Exp Ophthalmol* 2020;48(8):1043-1056

29 George SM, Lu FF, Rao M, et al. The retinal pigment epithelium: development, injury responses, and regenerative potential in mammalian and non-mammalian systems. *Prog Retin Eye Res* 2021;85:100969

30 Kim J, Lee YJ, Won JY. Molecular mechanisms of retinal pigment epithelium dysfunction in age-related macular degeneration. *Int J Mol Sci* 2021;22(22):12298

31 Shiose S, Hata Y, Noda Y, et al. Fibrinogen stimulates *in vitro* angiogenesis by choroidal endothelial cells via autocrine VEGF. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;42(9):777-783

32 Marneros AG, Fan J, Yokoyama Y, et al. Vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium is essential for choriocapillaris development and visual function. *Am J Pathol* 2005;167(5):1451-1459

33 Spaide RF, Jaffe GJ, Sarraf D, et al. Consensus nomenclature for reporting neovascular age-related macular degeneration data: consensus on neovascular age-related macular degeneration nomenclature study group. *Ophthalmology* 2020;127(5):616-636

34 Warden C, Brantley MA Jr. Glycine-conjugated bile acids protect RPE tight junctions against oxidative stress and inhibit choroidal endothelial cell angiogenesis *in vitro*. *Biomolecules* 2021;11(5):626

35 Obert E, Strauss R, Brandon C, et al. Targeting the tight junction protein, zonula occludens-1, with the connexin43 mimetic peptide, α CT1, reduces VEGF-dependent RPE pathophysiology. *J Mol Med* 2017;95(5):535-552