

# 茄病镰刀菌性角膜炎树鼯模型的建立

李妍<sup>1</sup>, 代解杰<sup>2</sup>, 孙晓梅<sup>2</sup>, 刘海<sup>1</sup>, 胡竹林<sup>1\*</sup>

(1. 昆明医科大学第四附属医院眼科, 云南省第二人民医院眼科, 云南省眼科研究所, 云南省眼科疾病防治研究重点实验室, 昆明 650021; 2. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所, 昆明 650118)

**【摘要】** 目的 采用临床分离的茄病镰刀菌感染树鼯角膜, 建立茄病镰刀菌性角膜炎树鼯模型。方法 茄病镰刀菌接种到沙保氏培养基, 26℃培养箱培养7 d, 收集真菌混悬液, 血细胞计数板调整孢子数量为 $1 \times 10^{10}$  CFU/mL。清洁级树鼯40只随机分为实验组( $n=30$ )、对照组( $n=10$ )。实验组用胰岛素针头(29 G)将真菌孢子混悬液50  $\mu$ L注入角膜基中央, 对照组注入生理盐水50  $\mu$ L。通过前段照相、共聚焦显微镜检查、病理组织学变化、感染角膜组织培养对模型进行评价。结果 真菌浸润范围、角膜上皮细胞和内皮细胞水肿程度、菌丝数量均与时间呈正相关; 炎性细胞浸润数量造模后第7天达到高峰, 以中性粒细胞为主; 实验各时间点均可见菌丝平行于基质纤维生长; 感染后角膜组织培养可见茄病镰刀菌生长; 造模成功率为86%。结论 采用基质注射茄病镰刀菌孢子的方法首次成功建立茄病镰刀菌性角膜炎树鼯模型。

**【关键词】** 树鼯; 茄病镰刀菌; 动物模型; 真菌感染; 角膜炎

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 04-0420-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.04.013

## Establishment of a tree shrew model of *Fusarium keratitis*

LI Yan<sup>1</sup>, DAI Jie-jie<sup>2</sup>, SUN Xiao-mei<sup>2</sup>, LIU Hai<sup>1</sup>, HU Zhu-lin<sup>1\*</sup>

(1. Department of Ophthalmology, The 4th Affiliated Hospital of Kunming Medical University (The 3rd People's Hospital of Yunnan Province, Yunnan Eye Institute, the Key Laboratory of Yunnan Province for Ophthalmic Research and Disease Control) Kunming 650021, China; 2. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118)

**【Abstract】 Objective** To establish a tree shrew model of *Fusarium solani* keratitis by injecting *Fusarium solani* conidia into the corneal stroma. **Methods** *Fusarium solani* was inoculated into Sabouraud culture medium and incubated at 26℃ for 7 days. Fungal suspension was collected and the number of spores was adjusted to  $1 \times 10^{10}$  CFU/mL on the blood cell count plate. Forty healthy tree shrews were randomly divided into experimental group ( $n=30$ ) and control group ( $n=10$ ). In the experimental group, 50  $\mu$ L of fungal spore suspension was injected into the cornea center with a 29G needle, and 50  $\mu$ L saline was injected in the control group. The models were evaluated by anterior segment photography, in vivo confocal microscopy, histopathology, and corneal tissue culture. **Results** The fungal infiltration, the degree of edema of corneal epithelial and endothelial cells, and the number of mycelium were positively correlated with time. The number of infiltrating inflammatory cells, mainly, neutrophils, reached a peak on the 7th day after modeling. The mycelial growth was parallel to the stromal fibers. After the successful establishment of the model, the corneal tissue culture showed the growth of *Fusarium solani*. The successful rate of modeling was 86%. **Conclusions** The tree shrew model of *Fusarium solani* keratitis is established by injecting spores of *Fusarium solani* into the cornea.

**【Key words】** Tree shrew; *Fusarium solani*; Animal model; Fungal infection; Keratitis

Corresponding author: HU Zhu-lin. Email: hu\_zhulin@163.net

**【基金项目】** 云南省卫生科技计划项目(2014NS040, 2017NS129); 昆明医科大学博士创新基金(2016D07)。

**【作者简介】** 李妍(1981-), 女, 博士研究生, 专业: 角膜病。Email: liyan\_8144@163.com

**【通讯作者】** 胡竹林(1965-), 男, 主任医师, 博士, 研究方向: 眼科学。Email: hu\_zhulin@163.net

真菌性角膜炎是我国主要致盲性眼病之一,植物外伤是主要诱因,近年来,随着抗生素和皮质类固醇激素的广泛使用及佩戴角膜接触镜的广泛流行,真菌性角膜炎发病率呈逐年增高的趋势<sup>[1-3]</sup>。我国真菌性角膜炎的主要致病菌为镰刀菌属(28%~65%)和曲霉菌属(11%~49%)<sup>[4]</sup>。局部抗真菌药物少、渗透性差、而全身的抗真菌药副作用大,使得真菌性角膜炎的治疗非常棘手。由于缺乏理想的模拟人角膜真菌感染的动物模型阻碍了真菌性角膜炎基础研究的发展,常见的真菌性角膜炎造模动物为小鼠、大鼠、兔等。其中,以小鼠造模的实验研究最多,小鼠与人类亲缘关系近,但是角膜太小,不易于观察和分子实验操作;兔角膜大易于造模取材,但与人类亲缘关系远,均不是最理想的角膜炎造模动物。树鼩(tree shrew)角膜大小适中,而且与啮齿类相比,与人类亲缘关系更近。因此,本研究以树鼩构建发病率最高的茄病镰刀菌性角膜炎。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

4~6月龄清洁级树鼩40只,体重(130±10)g,雌雄不限。由中国医学科学院医学生物学研究所提供【SCXK(滇)2013-0001】,操作地点:中国医学科学院医学生物学研究所实验室【SCXK(滇)2013-0006】。实验方案获得昆明医科大学伦理委员会通过(2014-Y02)。

#### 1.1.2 茄病镰刀菌

茄病镰刀菌及培养基菌种购于美国 ATCC 公司(ATCC36031),分离自患者;沙保氏葡萄糖琼脂培养基(梅里埃)。

#### 1.1.3 主要仪器

海德堡视网膜激光断层扫描系统Ⅱ代(德国),前段照相机(日本拓普康)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 真菌孢子制备方法

将茄病镰刀菌接种到沙保氏培养基中,置于26℃培养箱7d,生物安全柜内,0.1% NS 10 mL 反复冲洗培养皿菌丝表面,收集真菌混悬液,无菌脱脂纱8层过滤菌丝,血细胞计数板调整孢子数量为 $1 \times 10^{10}$  CFU/mL(CFU, colony-forming unit)。

#### 1.2.2 造模

将40只树鼩分为实验组30只,对照组10只

(均取右眼为实验眼)。100 mg/kg 盐酸氯胺酮肌肉注射麻醉后,碘伏消毒术眼3遍,盐酸奥布卡因眼液表面麻醉,聚维酮碘1 mL 冲洗术眼结膜囊,实验组用胰岛素针头从角膜缘进针致角膜基质中央,深度约1/2处注入孢子混悬液50  $\mu$ L( $1 \times 10^{10}$  CFU/mL);对照组注入0.1% NS 50  $\mu$ L。

#### 1.2.3 角膜组织培养

模型建立后第14天,无菌刀片刮取角膜溃疡周边组织接种到沙保氏培养基中,置于26℃培养箱14d,观察是否有真菌生长,长出真菌后菌丝涂片,1%亚甲基蓝染色镜下观察菌丝及孢子形态。

#### 1.2.4 指标观察

实验组及对照组术后第3天、7天、14天行前段照相,观察真菌性角膜炎形态变化;活体共聚焦显微镜检查及病理切片观察菌丝生长、周围组织炎性细胞浸润情况。模型建立后14d角膜病灶周边取材培养明确病原体。造模14d统计模型成功率。

## 2 结果

### 2.1 前段照相

裂隙灯下观察:造模后第3天,实验组角膜中央见高密度白色浸润改变,大小约1 mm×1.5 mm,浸润灶边缘毛躁,病灶周围角膜轻度水肿,周边角膜透明(图1A);对照组角膜中央轻度浑浊,未见高密度病灶改变(图1D)。造模后第7天:实验组角膜浸润范围扩大,病灶周围角膜水肿,虹膜纹理欠清(图1B);对照组角膜完全透明,注射生理盐水完全排出基质(图1E)。造模后第14天:实验组角膜病灶密度增高,病灶周围见大量毛刺样浸润,可见卫星病灶,瞳孔看不清(图1C);对照组:角膜透明,未见任何改变(图1F)。

### 2.2 活体共聚焦显微镜检查

#### 2.2.1 角膜上皮细胞

造模后第3天,实验组角膜上皮细胞呈多边形,部分细胞边界不清(图2A1);第7天,部分角膜上皮细胞体积变大、边界模糊(图2A2);第14天病灶区角膜上皮细胞体积均变大,呈不规则形状,部分细胞边界模糊(图2A3)。对照组角膜上皮呈多边形,大小一致,边界清晰(图2A4)。

#### 2.2.2 角膜基质

造模后第3天、7天、14天,均见基质内细长菌丝杂乱生长,呈高反光,可见菌丝间隔。第3天时菌丝密度小,第14天菌丝密度最高(图2B1-B3)。对

照组角膜基质内见基质细胞,核呈圆形高反光,胞体反光弱,呈网状相互连接(B4)。

角膜内皮:造模后第 3 天,实验组角膜内皮细胞稍水肿,呈多边形,边界清晰(图 2C1);第 7 天,角膜

内皮细胞水肿加重呈类圆形,高反光,细胞间连接疏松(图 2C2);第 14 天,角膜高度水肿,边界消失,形态看不清(图 2C3)。对照组第 3 天,角膜内皮细胞规则 5~7 变形,大小一致,边界清楚、呈低反光(图 2C4)。

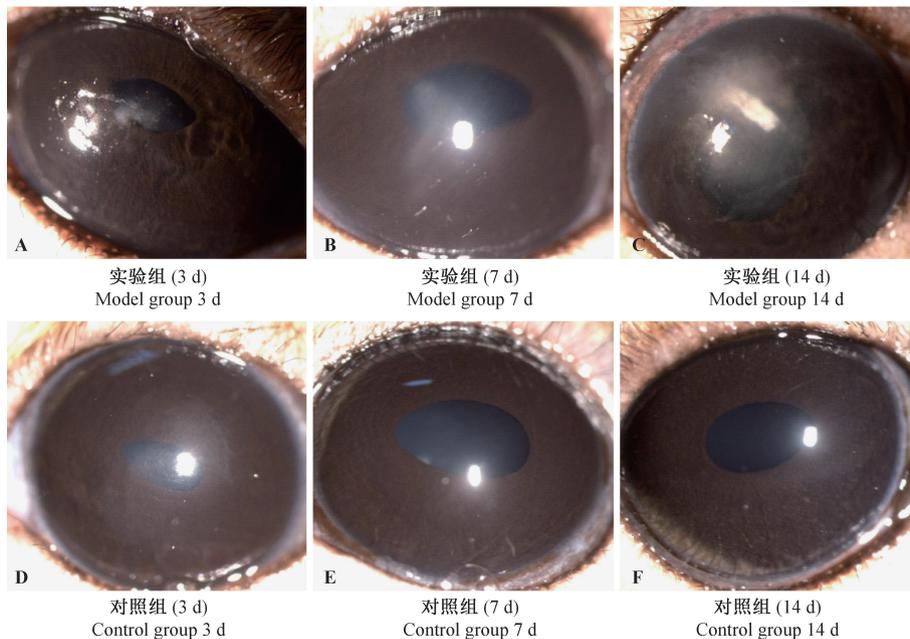


图 1 两组眼前段照相对比图

Fig. 1 Comparison of the anterior segment photographs between the two groups

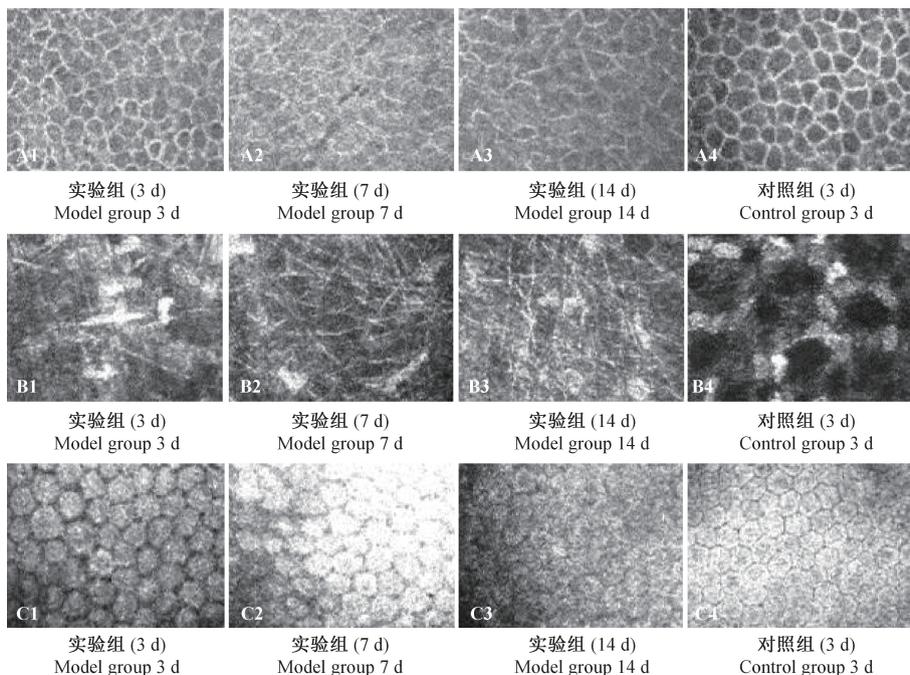


图 2 活体共聚焦显微镜观察两组角膜各层组织变化

Fig. 2 Changes of the corneal tissues observed by in vivo confocal microscopy

### 2.3 病理组织学

实验组第 3 天、7 天、14 天均可见角膜组织炎性细胞浸润,其中第 7 天时炎性细胞数量最多、以中性

粒细胞为主,第 14 天可见分叶状的中性粒细胞及单核细胞;角膜水肿增厚,可见菌丝平行于基质纤维生长,接近角膜内皮面(图 2A-C,红色箭头指向菌

丝);对照组角膜无水肿,基质层见基质细胞规则排列,未见炎性细胞浸润(图 2D)。

## 2.4 角膜组织培养

造模第 14 天,角膜组织取材培养第 5 天,见白

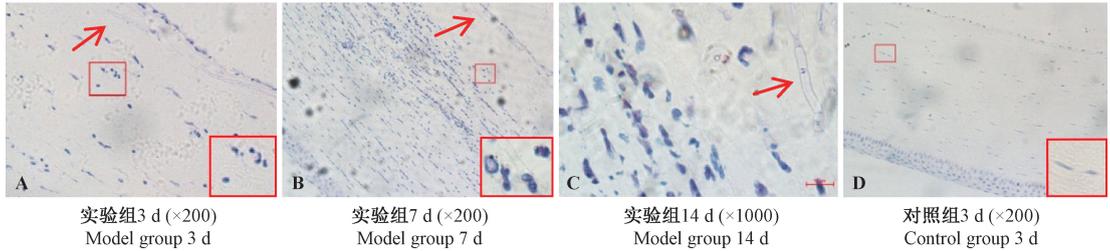


图 3 各时间点角膜病理组织学变化

Fig. 3 Pathological changes of the corneal tissues at different time-points

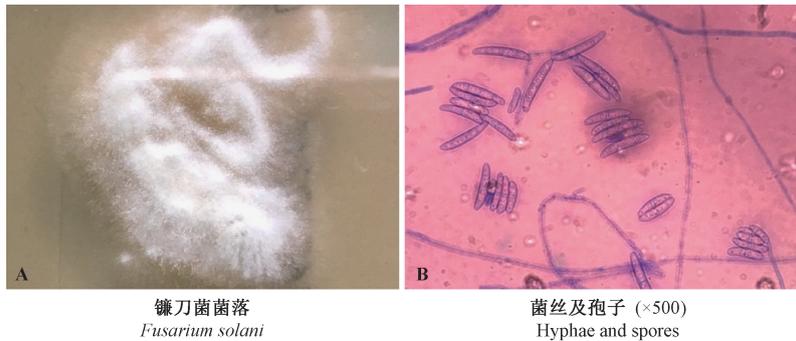


图 4 实验组角膜组织培养及涂片查菌丝

Fig. 4 Appearance of a cultured corneal tissue and a smear to detect the fungal hyphae

## 2.5 模型成功率

实验组 30 只树鼯,30 只眼,观察期满 14 d 时,26 眼出现镰刀菌感染病灶表现,造模成功率为 86%。

## 3 讨论

树鼯隶属攀鼯目,广泛分布于东南亚、南亚和中国南部等地区。由于其独特的特点,如体型小、脑-体重比例高、生殖周期短、寿命短和饲养成本低等,在生物医学研究中被认为是可望替代灵长类动物的新型实验动物<sup>[5]</sup>。树鼯在生理解剖、神经发育、肝炎病毒感染特性及心理应激模式等方面与灵长类,甚至与人类高度相似<sup>[6]</sup>。昆明动物所近期将树鼯和啮齿类的蛋白质序列与人的同源基因进行一对一对比时,发现人与树鼯之间较人与啮齿类之间拥有更高的蛋白质相似度,进一步说明树鼯与灵长类亲缘关系更近<sup>[6]</sup>。同时研究发现树鼯与灵长类在一些重要的神经系统和免疫系统信号通路中拥有高度的同源性<sup>[7]</sup>。近几年,国内外以树鼯构建各种疾病

色菌落生长,菌落表面见菌丝呈毛刷样生长(图 2A);涂片染色(1% 亚甲基蓝)后镜下观察见真菌菌丝及镰刀状分生孢子(图 2B)。

模型进行研究的报道逐年增多,主要应用于近视、肝炎、脑功能及神经退行性疾病、病毒性脑炎、心理应激、糖尿病、肺癌等疾病的基础研究<sup>[8-14]</sup>,其中树鼯近视动物模型的构建已被国际公认。树鼯角膜直径约 8~9 mm,横径 7~8 mm,分为 5 层,角膜各层结构与人类比较接近<sup>[15]</sup>,是角膜疾病理想的造模动物。至今,未见以树鼯为实验动物构建真菌性角膜炎的相关研究报道,因此,本实验采用树鼯作为实验动物构建茄病镰刀菌角膜炎模型。

裂隙灯前段照相显示,实验组造模后第 3~14 天病情逐渐加重,真菌浸润范围扩大,菌丝向周围组织侵犯形成的毛刺状改变增多,角膜浑浊水肿加重,观察期内未见角膜穿孔病例。与小鼠构建镰刀菌性角膜炎模型相比,树鼯的病情发展较为迟缓,研究者以 C57BL/6 小鼠<sup>[16,17]</sup>和 BALB/c 小鼠<sup>[18,19]</sup>接种镰刀菌孢子后,1~3 d 即可出现严重角膜浸润改变,4~6 d 即可出现角膜溶解穿孔。这一现象可能与 C57BL/6 小鼠容易诱发免疫耐受、BALB/c 小鼠免疫缺陷有关,导致真菌感染时机体防御能力降低,利

于真菌生长。病理组织学观察发现,树鼩造膜第 3 天见中性粒细胞浸润、第 7 天聚集最多、说明树鼩镰刀菌性角膜炎急性炎症高峰期在第 7 天;第 14 天可见中性粒细胞及单核细胞,单核细胞的出现代表炎症开始进入慢性期,机体启动固有免疫;造膜 3 个时间点均可见菌丝平行于基质纤维生长;Chandra 等<sup>[17]</sup>研究发现炎症细胞浸润高峰出现在造膜后 2 d,本实验中炎症细胞浸润高峰在第 7 天,较 Chandra 等研究中小鼠模型明显延迟,可能系不同物种之间存在差异导致,但具体原因还需进一步研究。共聚焦显微镜(in vivo confocal microscopy, IVCM)使活体观察眼表组织及细胞结构的生理及病理变化成为可能,可以直接观察活体角膜中增殖的体积达微米及以上的微生物,目前 IVCM 已被广泛应用于感染性角膜炎的诊断。本实验造膜后第 3 天可观察到菌丝生长,此时菌丝密度低,第 14 天,菌丝密度最高、角膜上皮及内皮水肿最重,树鼩真菌性角膜炎病情随时间延长存在加重的趋势,在 IVCM 检查中表现为菌丝数量的增多、角膜上皮细胞和内皮细胞水肿、细胞间隙增宽。感染角膜组织培养是目前诊断真菌性角膜炎的金标准,本实验造膜后第 14 天取角膜溃疡周边组织培养第 5 天,发现白色菌落生长,菌落涂片镜下观察可见典型镰刀型分生孢子,可确定树鼩模型系镰刀菌感染所致。30 只树鼩接种镰刀菌孢子第 14 天,共有 26 只成功感染镰刀菌,成功率为 86%。

本实验不足之处:首先,实验树鼩数量太少,不能更好的了解树鼩发病的特点及接种成功率。其次,造膜采用的是基质注射法,不能模拟真实患者感染真菌性角膜炎的发病过程,限制了分子机制的研究。最后,本实验观察期太短,不能观察整个病程的发展过程。在后续实验中将改进以上不足。

综上,本研究结果显示,树鼩可成功构建镰刀菌性角膜炎动物模型。与非人灵长类动物相比,树鼩来源广泛、价格低廉、角膜结构大小与人类相近,可预测树鼩在角膜感染疾病相关研究中具有良好的应用前景。

### 参 考 文 献

[ 1 ] Gower EW, Keay LJ, Oechsler RA, et al. Trends in fungal keratitis in the United States, 2001 to 2007 [J]. *Ophthalmology*, 2010, 117(12): 2263-2267.

[ 2 ] Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Meenakshi R, et al. Microbial keratitis in South India: Influence of risk factors, climate, and

geographical variation [J]. *Ophthalmic Epidemiol*, 2007, 14(2): 61-69.

[ 3 ] Srinivasan M. Fungal keratitis [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2004, 15: 321-327.

[ 4 ] 孙旭光,王智群,罗时运,等. 眼部真菌感染的病原学分析 [J]. *中华眼科杂志*, 2002, 38(7): 405-407.

[ 5 ] 许凌,范宇,蒋学龙,等. 树鼩进化分类地位的分子证据 [J]. *动物学研究*, 2013, 34(2): 70-76.

[ 6 ] 徐林,张云,梁斌,等. 实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述 [J]. *动物学研究*, 2013, 34(2): 59-69.

[ 7 ] Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew, a rising model animal genetically related to primates [J]. *Nat Commun*, 2012, 4: 1-9.

[ 8 ] Norton TT. Animal models of myopia: learning how vision controls the size of the eye [J]. *ILAR J*, 1999, 40(2): 59-77.

[ 9 ] McBrien NA, Norton TT. 1994. Prevention of collagen crosslinking increases form-deprivation myopia in tree shrew [J]. *Exp Eye Res*, 59(4): 475-486.

[ 10 ] 李瑗,苏建家,杨春,等. 乙型肝炎病毒树鼩体内能行感染模型的研究历程和展望 [J]. *动物学研究* 2011, 32(1): 104-108.

[ 11 ] 沈培清,郑红,刘汝文,等. 中国树鼩实验动物化研究进展和展望 [J]. *动物学研究* 2011, 32(1): 109-114.

[ 12 ] Lihong Li, Zhuoran Li, Xin Li, et al. Reactivation of HSV-1 following explant of tree shrew brain [J]. *Neurovirol*, 2016, 22: 293-306.

[ 13 ] 吴晓云,李昉海,长青,等. 链脉佐菌素诱导树鼩 2 型糖尿病 [J]. *动物学研究* 2013, 34(2): 108-115.

[ 14 ] Rao MS, Reddy JK. Carcinogenicity of 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine in the tree shrew (*Tupaia glis*): light and electron microscopic features of pulmonary adenomas [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1980, 65(4): 835-840.

[ 15 ] Almubrad T, Akhtar S. Structure of corneal layers, collagen fibrils, and proteoglycans of tree shrew cornea [J]. *Mol Vision*, 2011, 17: 2283-2291.

[ 16 ] Zhang HM, Wang LY, Li ZJ, et al. A novel murine model of *Fusarium solani* keratitis utilizing fluorescent labeled fungi [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 110: 107-112.

[ 17 ] Sun Y, Chandra J, Mukherjee P, et al. A murine model of contact lens-associated *Fusarium* keratitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51: 1511-1516.

[ 18 ] Wu TG, Keasler VV, Mitchell BM, et al. Immunosuppression affects the severity of experimental *Fusarium solani* keratitis [J]. *J Infect Dis*, 2004, 190: 192-198.

[ 19 ] Hu JZ, Hu YF, Chen SK, et al. Role of activated macrophages in experimental *Fusarium solani* keratitis [J]. *Exp Eye Resh*, 2014, 129: 57-65.