

树鼩真菌性角膜炎模型的建立及甘露糖受体和 TNF- α 对炎症的影响

苗雨润, 贾杰, 黎晓慧, 袁园, 宋庆凯, 张志成, 李娜, 代解杰*

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 云南省眼科疾病防治研究重点实验室, 中国医学科学院医学生物学研究所实验树鼩标准化与应用研究省创新团队, 昆明 650118)

【摘要】 目的 研究茄病镰刀菌感染树鼩角膜过程中甘露糖受体和炎症因子的表达变化, 探讨真菌感染性角膜炎发生机制。**方法** 通过接触镜辅助法用茄病镰刀菌感染树鼩角膜, 前段照相、病理切片及活体共聚焦显微镜观察结果对动物模型进行评价。qPCR 检测树鼩角膜炎病发过程中的甘露糖受体、dectin-1、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达; 体外培养树鼩原代角膜细胞并进行感染实验。**结果** 树鼩真菌性角膜炎模型建立成功率为 84%。MR 与 dectin-1 在感染初期有高拷贝数阳性表达, 引起炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达峰值, 这些因子的表达与病症的严重程度呈正相关。角膜细胞体外感染前后 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达差异无显著性 ($P > 0.05$)。**结论** 建立的真菌性角膜炎树鼩模型, 其病理表现相与人类真菌性角膜炎症状接近。甘露糖受体可能参与调控机体对真菌感染的免疫应答反应, 机体自身的免疫能力可能对角膜炎病发与转归有重要作用。

【关键词】 树鼩; 真菌性角膜炎; 甘露糖受体; TNF- α

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 06-0752-08

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.06.013

Establishment of a model of fungal keratitis in tree shrew and the effects of mannose receptor and TNF- α on inflammation

MIAO Yurun, JIA Jie, LI Xiaohui, YUAN Yuan, SONG Qingkai, ZHANG Zhicheng
LI Na, DAI Jiejie*

(Center of Tree Shrew Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, the Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College. Yunnan Innovation Team of Standardization and Application Research of Tree Shrew. the Key Laboratory of Yunnan Province for Ophthalmic Research and Disease Control. Kunming 650118, China)
Corresponding author: DAI Jiejie. E-mail: dj@imbcams.com.cn

【Abstract】 Objective To determine the changes in the expression of mannose receptor and some inflammatory cytokines in the cornea of tree shrews infected by *Fusarium solanum*, and explore the mechanism of fungal infection keratitis. **Methods** A tree shrew cornea was infected by *Fusarium solanum* using a contact lens-assisted method. The animal model was evaluated by anterior segment photography, analysis of pathological sections, and *in vivo* confocal microscopy. qPCR was used to determine the expression of MR (mannose receptor), dectin-1, IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the tree shrew keratitis. The primary corneal cells of tree shrews were cultured and an infection experiment was carried out *in vitro*. **Results** The success rate of establishing the tree shrew fungal keratitis model was 84%. The positive expression of MR and dectin-1 at the early stage of infection caused peaks in the expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α ;

【基金项目】 云南省联合支持国家计划项目 (2015GA009); 云南省科技人才和平台计划项目 (2017HC019); 重点实验室运行补助专项 (2017DG008)。

Funded by Yunnan Joint Support for National Program (2015GA009), Yunnan Science and Technology Talent and Platform Program (2017HC019), the Key Laboratory of Yunnan Province for Ophthalmic Research and Disease Control (2017DG008).

【作者简介】 苗雨润, 男, 硕士, 研究方向: 人类疾病动物模型。Email: miaomiao415@vip.qq.com

【通信作者】 代解杰, 男, 研究员, 博士生导师。Email: dj@imbcams.com.cn

the expression of these factors was positively correlated with the severity of fungal keratitis in the tree shrews. There was no significant change in corneal epithelial cell infection before and after infection ($P > 0.05$). **Conclusions** The model of fungal keratitis in tree shrew is successfully established, and its symptoms are similar to those of human fungal keratitis. Type C lectin receptors may be involved in regulating the immune response to fungal infection. The immune system may play an important role in the development and progression of keratitis.

[Keywords] tree shrew; fungal keratitis; mannose receptor; TNF- α

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

真菌性角膜炎(fungal keratitis, FK)是由致病性真菌感染受损角膜所引发的、致盲率极高的感染性角膜病^[1]。目前临床缺乏低毒、高效的抗真菌感染药物,手术后真菌感染复发率高。目前 FK 已经成为所有类别感染性角膜炎中最为棘手的疾病,也是治疗耗费最昂贵的角膜感染疾病之一,FK 已经越来越受到全球眼科医生的关注^[2-4]。

树鼩(tree shrew, *Tupaia belangeri*),属哺乳纲攀鼩目。树鼩类人的眼部结构使其在眼科学方面得到了广泛应用^[5-6]。树鼩的角膜结构与人类非常相似,从前向后分为角膜上皮层、前弹力层、基质层、后弹力层和角膜内皮层,且各层结构占角膜厚度的比例与人类极为相似,啮齿类动物所不具备此特征^[7]。这表明树鼩角膜结构比啮齿类更易于建立角膜炎模型。此外,有研究发现树鼩与恒河猴的角膜内皮细胞具有相似的特征,即细胞面积较均衡、变异系数小和六边形细胞比例高等特点,树鼩与恒河猴被认是研究人类角膜内皮疾病的理想动物^[8]。与非人灵长类动物相比,树鼩来源广泛、价格低廉,在角膜疾病相关研究中具有良好的应用前景。本研究利用树鼩建立与人类 FK 病症接近的模型,探讨 FK 病因形成的分子机制。

甘露糖受体(mannose receptor, MR)属于 C 型凝集素超家族成员,可通过胞外区识别和结合特定的糖类分子,在识别病原体、递呈抗原和保持内环境稳定中发挥作用^[9-10]。巨噬细胞(M ϕ)可通过 MR 来吞噬许多非调理素化的微生物,包括细菌、真菌和原生动物(protozoa)等。M ϕ MR 识别病原体后,可导致细胞活化,诱导炎症因子等细胞因子的合成。M ϕ 膜在肌动蛋白细胞骨架的介导下可发生变形运动,包绕病原体或病原体感染的靶细胞,形成吞噬小体,进而消化、杀伤病原体^[11-12]。Newman 等^[13]发现,人树突状细胞(dendritic cells, DC)可通过 MR 特异性地识别并吞噬白色念珠菌,并在溶酶体水解酶的作用下杀伤病原体。MR 是否参与 FK 的发生,目前尚不清楚。本研究利用树鼩建立 FK

感染模型,检测 FK 发病过程中 MR、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达变化,探讨 FK 发病的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

55 只成年滇缅树鼩,雌雄不限,年龄 2 ~ 3 周岁,体重 110 ~ 130 g,来自中国科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心【SCXK(滇)K2013 - 0001】,实验在中国医学科学院医学生物学研究所进行【SYXK(滇)K2013 - 0001】。所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审批号:DWSP201805016)。

1.1.2 试剂与仪器

茄病镰刀菌两株购自美国 ATCC 公司:茄病镰刀菌生物检定参照物 ATCC90866,茄病镰刀菌生物检定参照物 MYA-3636。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA, Solarbio),马铃薯葡萄糖肉汤培养基(PDB, Solarbio)。亲水性角膜接触镜(海昌隐形眼镜),妥布霉素地塞米松滴眼液(s. a. ALCON-COUVREUR n. v.),苏木精染料,伊红染液,青霉素(HyClone),链霉素(HyClone),显微操作仪(Nikon, C-DSD230),倒置显微镜(Nikon, ECLIPSE),CO₂ 孵育箱(Forma, CO₂ T/C)。

1.2 方法

1.2.1 真菌孢子菌丝悬液制备

茄病镰刀菌菌液涂布于 PDA 培养基表面,37℃ 培养 3 d 后置于 28℃ 培养,培养 7 d 后取出,用无菌生理盐水反复冲洗培养皿菌落表面,收集真菌菌丝体孢子混悬液,利用血球计数板计数并调整至孢子数量为 2×10^8 CFU/mL(Colony Forming Unit)。

1.2.2 FK 树鼩模型的建立

55 只树鼩随机分为实验组 25 只,药物对照组 20 只,阴性对照组 10 只(实验眼均为右眼,左眼均作为空白对照)。实验组树鼩腹腔注射 0.2 mL 2% 戊巴比妥钠溶液麻醉,碘伏溶液消毒眼周,无菌生

理盐水冲洗术眼眼球。用手术刀片轻轻划伤术眼角膜表面,滴加茄病镰刀菌菌丝孢子悬液,加盖角膜接触镜后缝合。感染 48 h 后拆线,庆大霉素滴眼液滴眼每日 1 次。药物实验组在此基础上每隔 24 h 在术眼滴加妥布霉素地塞米松滴眼液。阴性对照组仅做划伤处理,不滴加茄病镰刀菌菌丝孢子悬液,48 h 后拆线。隔日观察动物临床表现。

1.2.3 树鼩 FK 模型的评价

手术后隔日观察角膜炎形态变化,包括①水肿大小、②感染灶大小、③有无溃疡和新生血管、④球结膜充血程度、⑤前房炎症反应、⑥瞳孔大小、⑦对光反射,判断炎症反应的严重程度。取感染不同时间段(感染 3、5、7、10、14 d)的树鼩角膜,用苏木精-伊红(HE)染色,制作病理切片,观察角膜炎细胞浸润和组织坏死情况。使用共聚焦显微镜观察感染不同时间点的树鼩角膜组织的炎症病灶范围大小及严重程度。

1.2.4 C 型凝集素受体及炎症因子在树鼩 FK 模型中的表达变化情况

RT-qPCR 法检测感染后 3、5、7、10、14 d 的实验组和药物组树鼩角膜 MR、dectin-1、IL-1β、IL-6、TNF-α 的相对表达量。根据 NCBI 中树鼩基因组序列,采用 primer 5 设计引物,引物序列、扩增片段长度见表 1。

1.2.5 细胞体外感染实验

树鼩角膜内皮细胞、上皮细胞及基质细胞的体外分离培养、纯化并鉴定参见文献^[14-15]。

2 × 10⁸ CFU/mL 茄病镰刀菌菌丝孢子液灭活后加入到细胞培养液中培养 3 d,RT-qPCR 检测角膜内皮细胞、上皮细胞及基质细胞的 MR、dectin-1 及 IL-1β 相对表达量。

表 1 RT-qPCR 实验所用引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
MR-F	5'-ACGCCGATTGTGTTGTAA-3'
MR-R	5'-GACTGTTGCTGAGGATTA-3'
dectin-1-F	5'-CAAGCGGAGAACAGGAAG-3'
dectin-1-R	5'-TTGGAGAACTGGTAGCATT-3'
IL-1β-F	5'-GCCAACAACACAGACATAG-3'
IL-1β-R	5'-CTTCTCTTACGACTGGATCA-3'
IL-6-F	5'-CTCTCAGCACCTGCCGAAT-3'
IL-6-R	5'-GCCACGACCTCTTCATAG-3'
TNF-α-F	5'-GGATGCCTACTGCTACAAC-3'
TNF-α-R	5'-ATACGCTGACCATACTTGAG-3'
GAPDH-F	5'-CTTCAACTCTGGCAAGGT-3'
GAPDH-R	5'-AAGATGGTGATGGACTTC-3'

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,连续变量统计推断分析 C 型凝集素受体与炎症因子表达量,Wilcoxon 配对秩和检验进行两个配对样本非参数检验。用 Mann-Whitney U 检验进行两个独立样本非参数检验组间差异性。当 P < 0.05 时,差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 树鼩真菌感染角膜症状

实验组树鼩在感染 3 d 后角膜水肿,结膜充血,溃疡灶不明显。感染 5 d 后,结膜充血,溃疡灶呈异常白色。感染 7 d 后,溃疡灶明显,病情趋于转归。感染 10 d 后,树鼩角膜局部灰白色浑浊,感染灶继续变小,溃疡灶不明显。在感染 14 d 后,溃疡灶已不可见(图 1)。

药物组树鼩比实验组病情更为严重(图 1),平均病程时间比实验组树鼩的病程长 5~7 d。少数动物在感染后感染 5 d 后角膜内皮充血(图 2A),第 7 天炎症反应加剧,全眼化脓,病症累及基质层(图 2B)。

2.2 角膜组织病理学检查结果

茄病镰刀菌感染后,树鼩角膜结构明显改变。实验组感染后 3 d,角膜细胞坏死上皮层及前弹力层内有大量炎细胞浸润;感染后 5 d,角膜上皮组织缺损,细胞排列不规则并向角膜基质深层蔓延,可见大量炎性细胞。感染后 7 d,炎性细胞浸润相对减少,角膜上皮有重构趋势,前弹力层仍有缺损。感染后 14 d,上皮细胞层完成重构,但仍存在少量炎性细胞及坏死组织,前弹力层与上皮层界限恢复周围上皮细胞基本恢复重排。阴性对照组树鼩角膜未见溃疡灶,角膜结构未发生改变。

药物组树鼩的角膜组织结构改变较实验组动物更为明显。药物组动物角膜在感染后 5 d 病理特征与实验组感染后 3 d 相似,前弹力层部分消失或折叠。感染后 7 d 角膜上皮组织缺损,可见大量多核巨噬细胞等炎性细胞。感染后 10 d 角膜上皮开始重构,前弹力层再次出现,炎细胞浸润相对减少。感染后 14 d,前弹力层与上皮层界限恢复。感染后 18 d,上皮细胞基本恢复重排,有部分炎性细胞残留。对照组角膜上皮和前弹力层结构完整、细胞形态正常(图 3)。活体共聚焦显微镜结果显示,感染后 5 d 病灶已连接成块状区域;感染后 7 d,病灶已

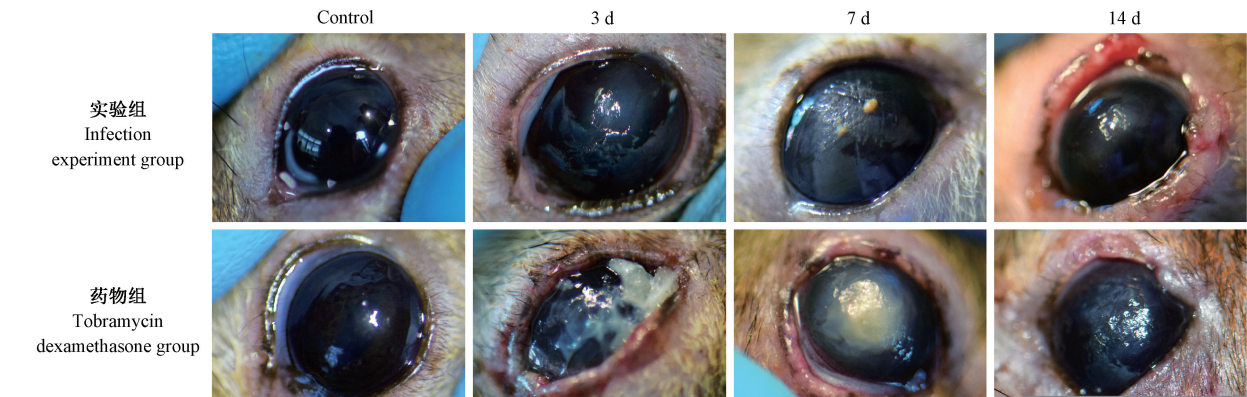


图 1 树鼯 FK 模型前段

Figure 1 Photograph of the anterior segment of tree shrew fungal keratitis

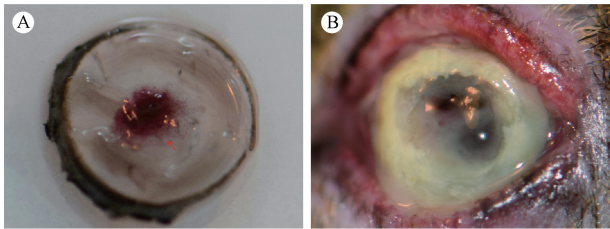


图 2 树鼯 FK 角膜组织前段

Figure 2 Fungal keratitis in the corneal tissue anterior of tree shrew

局部由块状变为点状;感染后 14 d,仅可见部分炎性细胞形成的反光区域(图 4)。

2.3 茄病镰刀菌感染树鼯角膜组织过程中 MR、dectin-1 与炎症因子表达变化

IL-1 β 与 IL-6 在感染初期呈现较高的表达量,在感染后 7 d 表达量到达峰值,感染后 14 d 回归正常水平;TNF- α 在感染后 3 d 出现峰值表达,之后表达量逐渐降低,在感染后 14 d 恢复正常水平。MR 在感染后 3 d、5 d 有阳性表达,dectin-1 在感染后 5

d、7 d 有阳性表达(图 5)。
药物组感染后的 MR 与 IL-1 β 表达量变化趋势与实验组一致,但两者的同期表达量显著低于实验组(图 6)。

2.4 体外细胞感染实验

体外培养树鼯角膜细胞结果见图 7,三种细胞的细胞形态及细胞活力未见明显变化,三种细胞内的 MR、dectin-1 与对照组之间没有统计学差异(图 8)。

3 讨论

FK 是由于真菌感染引起的一种全球性致盲性眼病,近年来我国 FK 患者不断增多,在某些地区严重化脓性角膜炎中真菌已经取代细菌成为首要的致病病原体^[16-17]。常用的 FK 建模接种方法包括:角膜基质注射法^[18]、针刺法^[19]、感染角膜植片法^[20]、角膜划痕法^[21]、仿准分子激光角膜上皮磨镶术(LASEK)法^[22]与角膜接触镜法^[23-24]。本研究发

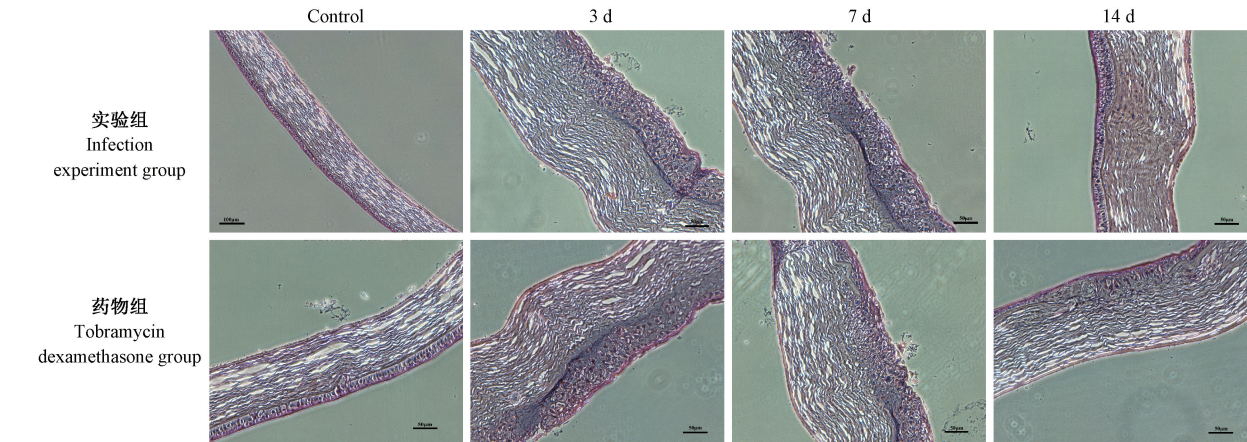
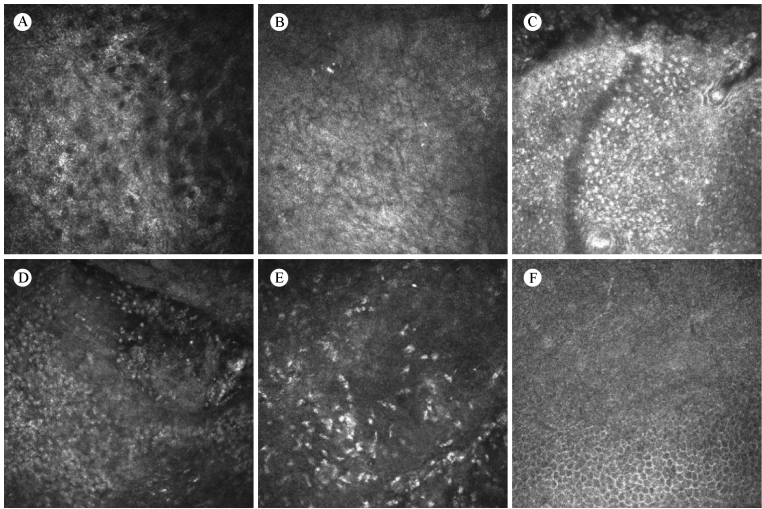


图 3 树鼯 FK 病理切片

Figure 3 Pathological section of fungal keratitis of tree shrew



注:A. 感染后 3 d 树鼯角膜活体共聚焦显微镜观察结果;B. 感染后 5 d 树鼯角膜活体共聚焦显微镜观察结果;C. 感染后 7 d 树鼯角膜活体共聚焦显微镜观察结果;D. 感染后 10 d 树鼯角膜活体共聚焦显微镜观察结果;E. 感染后 14 d 树鼯角膜活体共聚焦显微镜观察结果;F. 空白对照组树鼯角膜活体共聚焦显微镜观察结果。

图 4 树鼯 FK 活体共聚焦显微镜检查

Note. A – E. The results of tree shrew corneal confocal microscopy observations after 3, 5, 7, 10, and 14 days after infection, respectively. F. The results of confocal microscopy observation of tree shrew cornea in the blank control group.

Figure 4 Tree shrew fungal keratitis observed by confocal microscopy *in vivo*

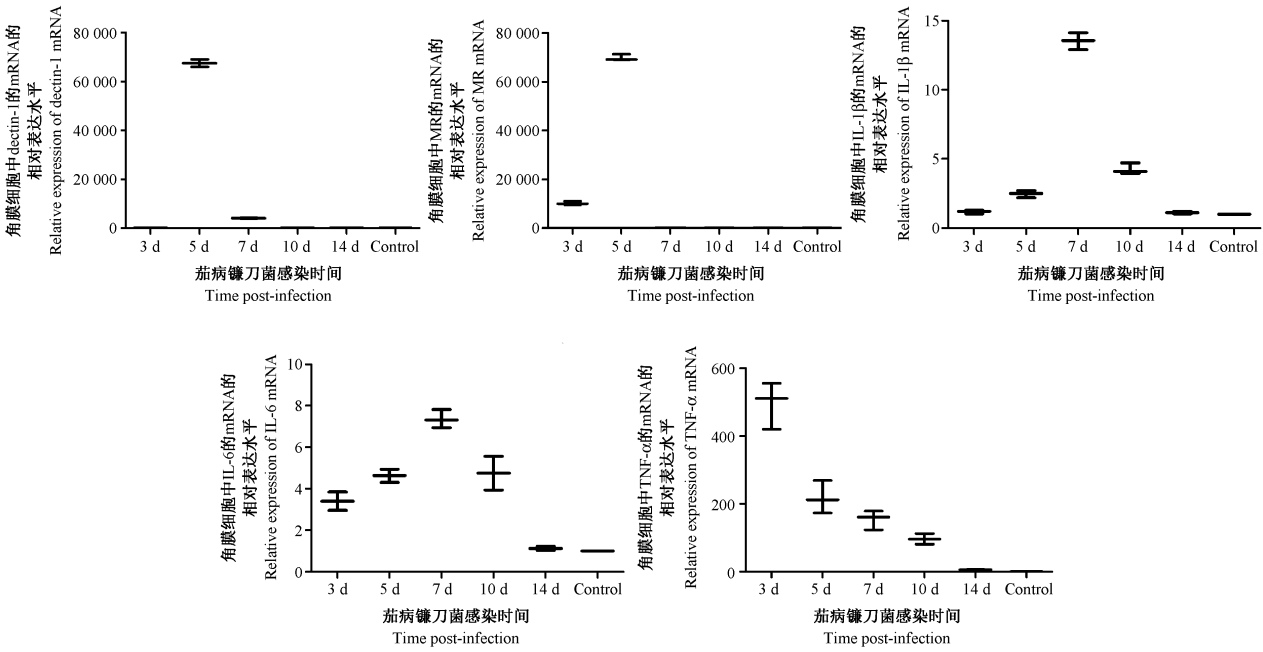


图 5 实验组树鼯角膜组织中 MR、dectin-1 与炎症因子表达变化

Figure 5 Changes in expression of MR, dectin-1, and inflammatory factors in corneal tissue of experimental tree shrew

现,利用角膜接触镜辅助法可以成功建立树鼯 FK 模型。相对于豚鼠、兔及小鼠等啮齿类模型,树鼯 FK 模型有更接近于人类 FK 的病理表现及免疫特征。

角膜接触镜辅助法建立的树鼯 FK 模型后 24 ~ 36 h 出现症状,3 ~ 4 d 即可发生非特异性改变,4 ~ 6 d 即可出现典型症状,此时病症表现最为严重,而在第 7 ~ 10 天病情开始转归;典型的病症表现为角

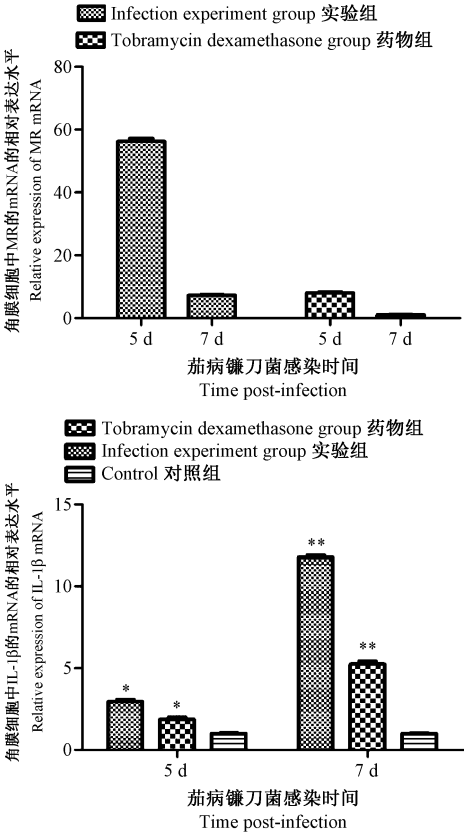
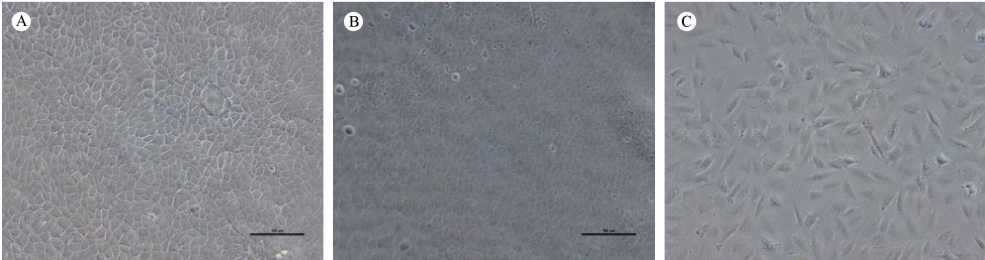


图6 药物组树鼯角膜组织中MR与IL-1β的表达
Figure 6 Expression of MR and IL-1β in the corneal tissue of drug group tree shrew

膜浸润灶呈灰白色或灰色,致密,外观干燥而表面欠光泽,呈牙膏样或苔垢样外观,表面由菌丝和坏死组织形成边界清楚的灰白色隆起病灶(菌丝苔被),有时在角膜病灶旁可见伪足或卫星样浸润灶。溃疡周围有胶原溶解形成的浅沟,或抗原抗体反应形成的免疫环,为机体对真菌的抗原、抗体反应,菌丝灶后的角膜内皮面水肿皱折,可见灰白斑块状沉

着物(内皮斑)。前房积脓,呈灰白色,黏稠或呈糊状。这与人类FK感染后发病时间与典型临床表现基本是一致的^[25]。病理组织学观察发现,树鼯建模感染后第3天可见中性粒细胞浸润及多核巨噬细胞,第5天溃疡层浸润最深,说明病情在第5天最为严重,且病灶是由角膜上皮层纯质延伸逐渐累及前弹力层,病程发展过程中除个别病情极重的动物,病灶基本不会扩散累及到基质层,这与人类外伤型FK的临床表现是极为相似的。以往FK模型多利用兔及豚鼠来建立,但至今仍没有可靠证据证明兔和豚鼠具有前弹力层,所以在真菌外伤感染形成病灶的浸润过程在这两种动物模型上尚未得到与人类FK相似的证据^[26]。感染第7天中性粒细胞及多核巨噬细胞聚集最多、说明树鼯镰刀菌性角膜炎急性炎症高峰期在第7天,同时可见单核细胞,这与李妍等^[27]报道的情况相似。

正常的角膜上皮具有识别病原体的能力,眼表模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)主要在角膜上皮细胞和树突状细胞等细胞膜表面表达,例如MR、Dectin-1、Dectin-2、胶原凝集素和树突细胞特异性细胞间黏附分子-3-结合非整合素(DC-SIGN)都参与抗真菌免疫过程^[28]。其中MR是一种跨膜蛋白,属于第VI组CLR,能够识别暴露在真菌细胞壁的甘露糖残基,激活NF-κB,诱导IL-12、IL-8、IL-1β、IL-6和巨噬细胞-粒细胞集落刺激因子GM-CSF,同时可以促进白色念珠菌感染中的抗真菌Th17型细胞免疫反应^[12]。实验中发现,MR与dectin-1在正常树鼯角膜组织中没有表达或仅有微量表达,但在受到真菌刺激后可以激活其表达,在感染3d后,树鼯角膜组织中MR有为期2~3d的高拷贝数阳性表达,一般在感染后5d时表达量



注:A. 体外培养(tree shrew)角膜内皮细胞;B. 体外培养(tree shrew)角膜上皮细胞;C. 体外培养(tree shrew)角膜基质层细胞。

图7 树鼯角膜各层细胞的体外培养

Note. A. *In vitro*-cultured tree shrew corneal endothelial cells. B. Cultured tree shrew corneal epithelial cells. C. Cultured tree shrew corneal stromal cells.

Figure 7 *In vitro* culture of corneal cells in tree shrew

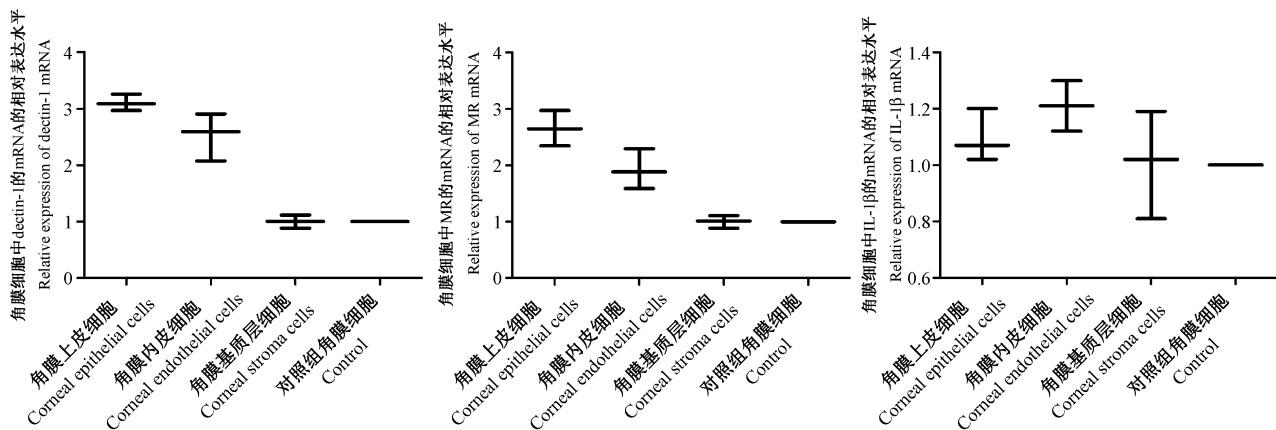


图 8 树鼩角膜各细胞感染后 MR、dectin-1 与 IL-1α 表达情况

Figure 8 The expression of MR, dectin-1, and IL-1β of corneal cells in tree shrew after infection

到达峰值,dectin-1 在感染后 5~7 d 也有高拷贝数的阳性表达,伴随着 IL-1β 与 IL-6 的表达量达到峰值,推测 MR 与 dectin-1 在后续的固有免疫应答阶段行使抗原识别的作用上调 Th1 型细胞炎症因子的表达而参与调节炎症反应。此外,TNF-α 在感染初期即出现峰值表达,随后表达量一直处于下调状态,说明 TNF-α 可能在 FK 病程初期的非特异性免疫中起到重要作用,由病理切片结果可以推测,此时的 TNF-α 可能主要由角膜上皮病灶上的多核巨噬细胞分泌。

树鼩角膜上皮与角膜内皮经真菌刺激后表达 dectin-1 与 MR,但并不能产生 IL-1β,提示 FK 的发生可能仍需要免疫系统的参与调节,这与有学者利用局部使用强效免疫抑制剂环孢素 A 的方法来治疗 FK 一致^[29]。免疫系统既可以参与 FK 的机体免疫防御,而其过表达又会引起过度的炎症反应而加重病情。寻找免疫反应强度与炎症控制之间的平衡点可能有助于 FK 的临床治疗。此外,调节病患自身的免疫能力与免疫相关分子表达水平也许能为 FK 的治疗提供新的思路。

参 考 文 献(References)

[1] 赵凌军. 化脓性角膜炎的病原学特征及感染危险因素分析[J]. 眼科新进展, 2014, 34(9): 878-881.
Zhao LJ. Etiological characteristics and risk factors of suppurative keratitis [J]. Rec Adv Ophthal, 2014, 34(9): 878-881.

[2] 王皎皎,赵敏,李鸿,等. 化脓性角膜炎 241 例临床分析[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(16): 1605-1607.
Wang JJ, Zhao M, Li H, et al. Clinical analysis of 241 cases of suppurative keratitis [J]. Acta Acad Med Mil Tert, 2009, 31(16): 1605-1607.

[3] 黎黎,梁艳闯,张琛,等. 化脓性角膜炎病原学分析[J]. 眼科新进展,2008,28(10):749-753.

Li L, Liang YC, Zhang C, et al. Etiological analysis of suppurative keratitis [J]. Rec Adv Ophthal, 2008, 28(10): 749-753.

[4] Sun XG, Zhang Y, Li R, et al. Etiological analysis on ocular fungal infection in the period of 1989-2000 [J]. Chin Med J (Engl), 2004,117:598-600.

[5] Phillips JR, Khalaj M, Mc Brien NA. Induced myopia associated with increased scleral creep in chick and tree shrew eyes [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(8): 2028-2034.

[6] Albon J. Connective tissue structure of the tree shrew optic nerve and associated ageing changes [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(5):2134-2144.

[7] Almubrad T, Akhtar S. Structure of corneal layers, collagen fibrils, and proteoglycans of tree shrew cornea [J]. Mol Vis, 2011, 17(17):2283-2291.

[8] 吴敏,李娜,孙晓梅,等. 猴和树鼩角膜内皮细胞的比较分析[J]. 中国实验动物学报,2016,24(2):164-168.
Wu M, Li N, Sun XM, et al. Comparison and analysis of corneal endothelial cells in monkey and tree shrew [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(2): 164-168.

[9] 刘小玲,曾令兵. 甘露糖受体结构、功能、表达和应用研究的新进展[J]. 水产学杂志, 2013, 26(01): 54-59.
Liu XL, Zeng LB. Recent advances in the structure, function, expression and application of mannose receptors [J]. Chin J Fish, 2013,26(01):54-59.

[10] Willment JA, Brown GD. C-type lectin receptors in antifungal immunity[J]. Trends Microbiol, 2008, 16(1):27-32.

[11] Gazi U, Rosa M, Singh S, et al. Fungal recognition enhances mannose receptor shedding through Dectin-1 Engagement[J]. J Biol Chem, 2011,286(10):7822-7829.

[12] van de Veerdonk FL, Marijnissen RJ, Kullberg BJ, et al. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to Candida albicans [J]. Cell Host Microbe, 2009, 5(4):329-340.

[13] Newman SL, Holly A. Candida albicans is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells

- [J]. Infect Immun, 2001, 69(11): 6813–6822.
- [14] 苗雨润, 宋庆凯, 陈玲霞, 等. 树鼩角膜内皮细胞体外原代培养方法的建立[J]. 实验动物科学, 2016, 33(05): 1–8.
Miao YR, Song QK, Chen LX, et al. Establishment of primary culture method for corneal endothelial cells of tree shrew[J]. Lab Anim Sci, 2016, 33(05): 1–8.
- [15] 苗雨润, 宋庆凯, 匡德宣, 等. 树鼩角膜原代上皮细胞的分离培养、纯化与鉴定[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(2): 130–135.
Miao YR, Song QK, Kuang DX, et al. Isolation, purification and identification of primary corneal epithelial cells of tree shrew[J]. Lab Anim Comp Med, 2017, 37(2): 130–135.
- [16] 王璐璐, 焦建慈, 贺焱, 等. 多元化治疗 252 例真菌性角膜炎的临床分析[J]. 中国实用眼科杂志, 2016, 34(1): 45–49.
Wang LL, Jiao JC, He Y, et al. Clinical analysis of 252 cases of fungal keratitis treated by diversification[J]. Chin J Pract Ophthalmol, 2016, 34(1): 45–49.
- [17] 姜亚萍, 陈轶卉. 真菌性角膜炎的治疗进展[J]. 国际眼科杂志, 2015, 15(9): 1542–1545.
Jiang YP, Chen YH. Advances in the treatment of fungal keratitis[J]. Int J Ophthalmol, 2015, 15(9): 1542–1545.
- [18] Yavas GF, Öztürk F, Küsbeci T, et al. Antifungal efficacy of voriconazole, itraconazole and amphotericin b in experimental fusarium solani keratitis[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2008, 246(2): 275–279.
- [19] Zhong W, Yin H, Xie L. Expression and potential role of major inflammatory cytokines in experimental keratomycosis[J]. Mol Vis, 2009, 15: 1303–1311.
- [20] Wu TG, Wilhelmus KR, Mitchell BM. Experimental keratomycosis in a mouse model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(1): 210–216.
- [21] Mitchell BM, Wu TG, Jackson BE, et al. Candida albicans strain-dependent virulence and Rim 13p-mediated filamentation in experimental keratomycosis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(2): 774–780.
- [22] 梁涛, 赵桂秋, 刘蓬蓬, 等. 仿 LASEK 法建立烟曲霉菌角膜炎动物模型的研究[J]. 眼科研究, 2008, 26(9): 641–644.
Liang T, Zhao GQ, Liu PP, et al. Establishment of an animal model of Aspergillus fumigatus keratitis by imitating LASEK[J]. Chin Ophthalmol Res, 2008, 26(9): 641–644.
- [23] O’Day DM, Head WS, Robinson RD, et al. Contact lens-induced infection—a new model of Candida albicans keratitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(7): 1607–1611.
- [24] Goldblum D, Frueh BE, Sarra GM, et al. Topical caspofungin for treatment of keratitis caused by Candida albicans in a rabbit model[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(4): 1359–1363.
- [25] 冯广忠, 李鹤玉, 盛宇, 等. 14 例茄病镰刀菌所致角膜溃疡临床分析[J]. 中国真菌学杂志, 2009, 4(03): 144–147.
Feng GZ, Li HY, Sheng Y, et al. Clinical analysis of 14 cases of corneal ulcer caused by Fusarium Solanum[J]. Chin J Mycology, 2009, 4(03): 144–147.
- [26] 张睿, 谢若衷, 周翔天, 等. 七种动物正常角膜组织结构的比较性研究[J]. 眼科, 2015, 24(05): 341–347.
Zhang R, Xie RZ, Zhou XT, et al. Comparative on normal corneal tissue structure of seven animals[J]. Ophthalmology, 2015, 24(05): 341–347.
- [27] 李妍, 李丽红, 刘海, 等. 树鼩茄病镰刀菌性角膜炎房水中 Th1/Th2 炎症因子的变化[J/OL]. 眼科新进展, 2017, (09): 1–3.
Li Y, Li LH, Liu H, et al. Changes of Th1/Th2 inflammatory factors in aqueous humor of tree shrew infected by Fusarium oxysporum keratitis[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2017, (09): 1–3.
- [28] Willment JA, Brown GD. C-type lectin receptors in antifungal immunity[J]. Trends Microbiol, 2008, 16(1): 27–32.
- [29] 王涌. 环孢素 A 联合氟康唑治疗真菌性角膜炎的临床观察[J]. 四川医学, 2011, 32(9): 1422–1423.
Wang Y. Clinical observation of fungal keratitis in the treatment with cyclosporine A combined with fluconazole[J]. Sichuan Med J, 2011, 32(9): 1422–1423.

[收稿日期] 2018–09–26