

陈柳,邱敏,代解杰. 病原体感染角膜炎机制及动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 137-144.

Chen L, Qiu M, Dai JJ. Research progress on the mechanism and animal models of keratitis caused by pathogen infection [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 137-144.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 020

病原体感染角膜炎机制及动物模型研究进展

陈 柳¹,邱 敏²,代解杰^{1*}

(1.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;2.昆明医科大学,昆明 650500)

【摘要】 感染性角膜炎是世界范围内的眼科常见疾病,是导致视力丧失和失明的重要原因。对微生物性角膜炎发病机制的全面认识、建立相关疾病的动物模型在研究宿主感染的免疫应答和感染机制、药物研发等方面扮演着重要作用,为临床治疗策略选择及基础研究提供了科学依据。随着医学研究的深入,我们对感染性角膜炎动物模型及致病机制进行归纳总结,期望对此有一个全面了解。

【关键词】 感染性角膜炎;发病机制;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0137-08

Research progress on the mechanism and animal models of keratitis caused by pathogen infection

CHEN Liu¹, QIU Min², DAI Jiejie^{1*}

(1. Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College Institute of Medical Biology, Kunming 650118, China.

2. Kunming Medical University, Kunming 650500)

【Abstract】 Microbial keratitis is a common ocular disease worldwide and is an important cause of vision loss and blindness. A comprehensive understanding of the pathogenesis of microbial keratitis is required for the establishment of animal models of related diseases. These models play an important role in studying the immune response and infection mechanism of host infections and drug development, and provide a scientific evidence for the selection of clinical treatment strategies and pursuing basic research. Here we summarize the animal models and the pathogenic mechanism of infectious keratitis to provide comprehensive understanding of the current research on these models.

【Keywords】 infectious keratitis; pathogenesis; animal models

角膜是眼球最先接触外界的部分,易受外伤,容易与各类微生物接触,继而引发感染性角膜炎^[1]。完整的眼表屏障抵制了大多数微生物的入侵,但一旦解剖屏障被打破,宿主对病原体的防御就不足以抵制感染,可引起角膜炎症,严重时导致失明。感染性角膜炎是一种潜在的威胁视力的眼

部疾病,由细菌、真菌、病毒、原生生物等病原体引起。由致病病原体引起的角膜炎,能侵入角膜基质引起炎症,并最终破坏这些结构^[2-3]。探索其发病机制,是目前研究的焦点,实验动物模型的建立有助于感染机制及防治的研究。本文就近年来病毒、真菌和细菌感染的动物模型建立及相关的发病

【基金项目】 NSFC-云南联合基金重点支持项目(U1702282);云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019);昆明市科技创新团队(2019-1-R-2483)。

【作者简介】 陈柳(1995—),女,硕士研究生,研究方向:人类疾病动物模型建立及机制研究。E-mail: chenliu19950623@163.com

【通信作者】 代解杰(1961—),男,研究员,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型建立及机制研究。E-mail: dj@imbcams.com.cn

机制进行归纳总结,为开展该领域研究的相关人员提供帮助。

1 病毒感染性动物模型

1.1 单纯疱疹病毒感染及动物模型

在发达国家,单纯疱疹病毒 1 型(herpes simplex virus, HSV-1)是感染性失明的主要原因。HSV-1 感染可发生在眼睛的任何部位;最常见的表现是上皮性或树突状角膜炎。对兔眼部接种病毒证实 HSV-1 感染也可诱发角膜内皮炎^[4]。宿主细胞对 HSV-1 的应答在眼内 HSV-1 感染的发病机制中起着重要作用^[5]。

原发性 HSV 感染可发生在儿童或青年通过粘膜直接接触,常表现为结膜炎伴眼睑囊泡。大多数眼部 HSV 是由三叉神经节潜伏的 HSV 感染再激活引起的,并伴有角膜内的病毒脱落。HSV 的再激活是由各种环境因素引发的,包括压力、发烧、紫外线照射以及激光治疗或外用糖皮质激素等医源性因素^[6]。Li 等^[7]研究了眼部接种后树鼩三叉神经节中的 HSV-1 感染,证实 HSV-1 潜伏感染三叉神经元。并且发现与小鼠相比,树鼩三叉神经节的病毒急性感染更微弱,没有来自感觉神经元的可检测的传染性病毒。其轻度感染可能与人类感染更相似,树鼩可能是研究 HSV-1 潜伏感染的很好的模型。夏丽坤等^[8]用雌性 NIH 小鼠成功地先建立了 HSV-1 潜伏感染的动物模型,再通过中波长紫外线照射小鼠角膜建立起了复发性单纯疱疹性角膜炎的实验模型。

感染期间,HSV-1 病毒在角膜上皮细胞中复制,并形成巨大的合胞体结构。这些细胞最终以坏死的方式破裂,并在周围组织中释放 HSV-1 病毒粒子,导致在角膜的不同层(上皮细胞、间质和内皮细胞)形成较大的角膜炎病变^[9]。单纯疱疹病毒性角膜炎(HSK)是由 HSV 感染的角膜细胞与浸润的炎症细胞相互作用引起的,在 24 h 内,炎症细胞(主要是中性粒细胞)涌入,但也有 NK 细胞、树突状细胞和巨噬细胞,它们在这一阶段的功能是限制病毒在组织内的传播。在感染后 7 d 开始,CD4⁺T 细胞到达角膜,产生各种细胞因子,如 IFN- γ 和 IL-17,这些细胞因子促进第二波中性粒细胞的浸润和激活,本质上更具致病性。这些中性粒细胞在角膜并被 CD4⁺T 细胞激活,脱粒并分泌炎症介质、蛋白酶和自由基,这是 HSK 中观察到的大部分组织损伤的原

因。有报道称,原发性 HSK 小鼠角膜中 IFN- γ 、IL-2 和 TNF α / β 的水平显著升高,提示病毒感染后眼内 CD4⁺T 细胞均为 Th1 细胞^[10]。又有研究小组证明 CD8⁺T 细胞在小鼠单纯疱疹病毒潜伏感染中起旁观者作用^[11]。

Mott 等^[12]用 FMS 样酪氨酸激酶 3 配体(Flt3L)免疫 BALB/c 或 C57BL/6 小鼠,其中 Flt3L 是体内 DCs(CD11⁺CD8 α ⁺)的强刺激因子,发现 CD11⁺CD8 α ⁺细胞数量的增加与 HSV-1 潜伏期的增加有关。此外,CD11c⁺CD8 α ⁺树突状细胞的过继转移与 HSV-1 潜伏期的降低有关。Bryant-Hudson 等^[13]已经证明,抑制程序性死亡 1 配体(PD-L1)与其受体 PD-1 的相互作用阻碍了 DCs 的激活和病毒滴度的升高。此外,研究还发现,HSV-1 感染过程中树突状细胞失活与多种树突状细胞命令性分子的下调有关,如 CD80、CD86、CD54、CCR7、CXCR4 和 MHC1^[14]。

在 HSV-1 感染期间,角膜上皮细胞显示出 toll 样受体(TLRs)的不同表达动态,TLR-4,7,8,9 在活动性角膜炎中显著上调^[15]。在小鼠模型中,敲除 TLR-2 已被证明是抑制角膜炎损伤的有效策略。相反,TLR-4 敲除小鼠出现严重角膜炎病变的速度更快^[16]。虽然 TLR-9 与 HSV-1 DNA 的连接启动了清除 HSV-1 的强烈免疫反应,但它也促进了导致角膜破坏的炎症过程^[17]。因此,通过分子模拟技术阻断 TLR-2 和 TLR-9 并激活 TLR-4 可能是一种新的、有效的策略来避免先天免疫介导的角膜损伤。

1.2 巨细胞病毒感染及动物模型

巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)是 β -疱疹病毒家族的成员,是世界范围内先天性感染的主要原因之一^[18]。Zhang 等^[19]建立了大鼠巨细胞病毒角膜炎动物模型,发现 CMV 可在体内广泛感染前段组织,包括角膜内皮、虹膜和小梁网,诱发相应的临床表现。Kandori 等^[20]的一项研究显示巨细胞病毒倾向于角膜内皮炎,而不是上皮性或基质性角膜炎。

虽然不像 HSK 那么频繁,但 CMV 引起的角膜炎由于确诊的角膜炎患者数量急剧增加而在最近引起了人们的关注^[21]。使用小鼠中的鼠巨细胞病毒(mouse cytomegalovirus, MCMV)作为模型系统,结果表明持续性 MCMV 同时存在于慢性活动状态和潜伏状态中^[22]。病毒对 CD34⁺髓系祖细胞(主要表现为 CMV 潜伏期)和其他存在于肺、角膜、视网膜和唾液组织中的细胞的嗜性使其成为最普遍和适

应性最强的病原体之一。因此,在免疫缺陷和免疫抑制的宿主中,机会性巨细胞病毒感染会出现广泛的症状;从无症状的病毒血症到巨细胞病毒综合征和组织侵袭性疾病,主要是由于 1 型免疫激活^[23]。

在 CMV 诱导的角膜炎期间,病毒在离开宿主细胞感染邻近细胞之前有策略地在伪 G1 期复制和组装^[24]。CMV 的这种复制现象已被证明与上皮性角膜炎、基质角膜炎和伴有不透明、分支、非溃疡性上皮病变的内皮炎有关^[25]。但是目前对于 CMV 如何导致病毒性角膜炎的机理仍不明确,只有相关动物模型的建立。CMV 导致角膜炎发生的具体途径仍在研究,尚无文献说明。

目前有关 CMV 感染的关键分子研究较多,可能会对 CMV 导致角膜炎机制研究提供有效靶点。比如,Puttur 等^[26]利用转基因小鼠,CD11c⁺ 树突状细胞中的 TLR9/MyD88 信号通路通过促进 NK 细胞 CD69 的表达和 IFN- γ 的产生,增强了 MCMV 的清除。同时,在浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells, pDCs)缺失的情况下,常规树突状细胞(conventional dendritic cells, cDCs)可通过 TLR9/MyD88 依赖的方式促进健壮的 NK 细胞效应细胞功能和 MCMV 的清除。同时, cDCs 来源的 IL-15 通过不依赖 TLR9/MyD88 的机制调控 NK 细胞脱颗粒。Szomolanyi-Tsuda 等^[27]发现在 TLR2 KO 小鼠中, MCMV 复制的早期控制受损,第 4 天在脾和肝中发现病毒滴度升高, TLR2 对 MCMV 的清除作用是由 NK 细胞介导的。以上研究发现 TLR2、TLR9 和 DC 与 CMV 感染有关,但病毒性角膜炎的潜在机制需要进一步研究。

2 真菌性感染动物模型

2.1 茄病镰刀菌感染及动物模型

镰刀菌属丝状真菌的成员,是最常引起人类角膜真菌病的病原体之一。镰刀菌角膜炎在炎热、潮湿、热带或亚热带气候地区的农业工人中最常见。镰刀菌病最常见的是角膜局部感染,但在不同国家经培养证实的真菌性角膜炎病例中,镰刀菌的发病率不同。在许多调查中,镰刀菌是主要的角膜真菌病病原,而曲霉属和念珠菌属则以其他研究为主,报道最多的病原体是茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)^[28]。

所有主要的真菌病原体都产生无性孢子(分生孢子),从环境中引入泪膜和眼表。Pinnock 等^[29]用

手术刀伤法或注射法均成功诱导了兔和人角膜的感染,对于茄病镰刀菌,感染后的体内培养组织学与临床感染的组织学相似,有致密的白色真菌斑块、角膜混浊、角膜浸润、水肿、溃疡形成、附着物病变、角膜新生血管和细胞减少。在兔和人的角膜中观察茄病镰刀菌的分生孢子粘附在基质上,一段时间后,菌丝穿透基质。镰刀菌分生孢子的细胞表面覆盖着一层保护性的疏水蛋白和小球藻层,这有助于屏蔽高免疫原性真菌细胞表面蛋白 β -葡聚糖和 α -甘露聚糖(被称为病原体相关分子模式),使其无法被免疫细胞识别^[30]。

Mukherjee 等^[31]利用体外接触镜方法建立的小鼠模型研究发现,茄病镰刀菌和尖镰孢菌的生物膜形成能力是致病的关键因素。在小鼠模型中引起角膜炎的能力似乎与生物膜的形成有关,但与生物膜的厚度无关。另外,镰刀菌产生的多种毒素包括镰刀菌醇、T-2 毒素、脱氧镰刀菌醇、二乙酰氧环萜醇和镰刀菌酸^[32],具有抑制吞噬功能、细胞内杀伤、细胞因子、抗原呈递和巨噬细胞活性氧(ROS)的产生,此外,它们还可能发挥抑制 T 细胞功能的作用^[33]。

Jin 等^[34]用灭活的茄病镰刀菌刺激人永生角膜上皮细胞,证实了来自镰刀菌的菌丝片段增加了 TLR2、3、4 和 6 mRNA 的表达以及 IL-6 和 IL-8 的释放。TLR2 和 TLR4 蛋白的表达也通过暴露菌丝片段得到增强。抗 TLR2 和抗 TLR4 单克隆抗体预处理也能抑制 IL-6 和 IL-8 的释放,结果表明 TLR2 和 TLR4 都参与了镰刀菌暴露后的信号响应。苗雨润等^[35]用茄病镰刀菌感染树鼩角膜,发现树鼩角膜上皮与角膜内皮经真菌刺激后表达 Dectin-1 与甘露糖受体(MR),但并不能产生 IL-1 β ,提示真菌性角膜炎的发生可能仍需要免疫系统的参与调节。其建立的真菌性角膜炎树鼩模型,病理表现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的发生与转归有重要作用,提示树鼩是角膜炎适合的动物模型。此外,角膜上皮细胞中表达的 Dectin-1、Dectin-2 可通过激活 Syk-MAPK 通路,促进细胞因子 IL-2、IL-10 和 TNF- α 的分泌,进而发挥抗真菌免疫功能^[36-37]。

2.2 白色念珠菌感染及动物模型

白色念珠菌(*Monilia albican*)是温带地区真菌性角膜炎的最常见原因。慢性眼表疾病和长期或

全身性使用皮质类固醇激素,似乎是念珠菌性角膜炎的主要诱因^[38]。酵母样及相关真菌引起的角膜炎可能类似细菌性角膜炎,具有上皮组织缺损、离散浸润和缓慢进展等特征^[39]。

酵母细胞壁的外层纤维由甘露聚糖或甘露蛋白组成,黏附性甘露蛋白在真菌与角膜组织的结合中发挥重要作用。这些凝集素样蛋白识别角膜上皮细胞表面的甘露糖或甘露糖蛋白。角膜损伤导致角膜表面上的甘露糖蛋白上调,因此,它可能在真菌性角膜炎的粘连和发病机制中起重要作用^[40]。形态发生是真菌病原体从酵母形态转变为菌丝形态的能力。虽然病原体在酵母阶段可以更有效地传播,菌丝形式却可以很好地适应入侵和破坏组织^[41]。菌丝能够生长并通过上皮细胞,进入间质,如果不减少菌丝,将最终进入前房。Sheppard 等^[42]证明念珠菌和丝状真菌通过胞吞作用侵入角膜上皮,胞吞作用由入侵蛋白介导,并通过蛋白水解酶破坏上皮细胞的紧密连接。

对真菌的先天和适应性免疫反应主要是由信号 c 型凝集素受体(CLR)介导的,其中 Dectin-1 在真菌感染的背景下是最典型的^[43]。对于真菌感染,先天和适应性免疫反应主要由 CLR 调节。Dectin-1 可以识别 β -葡聚糖,并通过其胞质信号域诱导多种细胞功能,在小鼠和人类对白色念珠菌和其他真菌的保护性免疫应答中至关重要。Marakalala 等^[44]利用小鼠模型发现,控制白色念珠菌对 Dectin-1 的要求是菌株特异性的,因为不同的白色念珠菌菌株在其细胞壁的组成和性质上存在差异,只有在体内感染时才会明显。Dectin-1 介导的对白色念珠菌感染的保护最近也被认为是由于肾浸润 DC 产生 I 型 IFN,这需要 Syk、CARD9 和 IRF5^[45]。其他起重要作用的信号 CLR 包括 Dectin-2、Mincle、DC-SIGN 和 MR^[43]。另外,邹嫣丽^[46]选用 BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠,用角膜基质注射法注射白色念珠菌孢子建立了真菌性角膜炎模型,结果显示感染早期两种品系小鼠血浆及受染角膜组织中均有较高水平 IL-17 的表达,中后期 IL-17 的表达下降,IFN- γ 的表达量明显升高。

3 细菌性感染动物模型

3.1 铜绿假单胞菌感染及动物模型

细菌性角膜炎约占所有微生物性角膜炎病例的 90%,其中铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)最常见^[47]。其起病急、发展迅速,若

未及时治疗,极易形成角膜溃疡,严重时可致盲。

假单胞菌的角膜感染与隐形眼镜的使用有关,在隐形眼镜出现之前很少被报道为一个问题。其菌毛与鞭毛以及细胞表面的疏水性都可以帮助其隐形眼镜的黏附^[47]。一些研究报道了使用戴隐形眼镜的动物模型来研究隐形眼镜相关的微生物角膜炎的发病机制,例如建立铜绿假单胞菌性角膜炎兔模型,研究中性粒细胞浸润和严重程度的关系^[48],铜绿假单胞菌性角膜炎大鼠模型研究细胞因子和趋化因子的变化^[49]。但这些动物模型有一些局限性,兔需要眼睑闭合或立膜手术来保留眼镜^[48],大鼠尽管反复进行细菌接种,但没有发生或低水平明显的微生物性角膜炎^[49]。Metruccio 等^[50]成功地建立了小鼠隐形眼镜佩戴模型,该模型在小鼠身上忠实地复制了几种与晶体相关的现象。通过佩戴隐形眼镜感染铜绿假单胞菌的小鼠模型,发现其与人类配戴隐形眼镜时对机会性微生物的感染风险是一致的。还发现在其他健康的角膜中,未接种铜绿假单胞菌的隐形眼镜佩戴可导致嗜中性粒细胞募集的副炎症反应发生,这一反应依赖于 MyD88 和 IL-1R。除此之外多种动物模型已被运用。例如,Pinnock 等^[29]发现,角膜基质注射法和角膜损伤法相比,前者角膜感染后表面覆盖的细菌更多,而兔和人的角膜感染结果相似,在感染 24 或 48 h 后测定菌落形成单位(CFU),尽管每种模型的细菌和处理技术存在差异,但 CFU 的变化很小。与 Pinnock 等^[29]人的观点一致,Okurowska 等^[51]采用两种不同菌株的铜绿假单胞菌,证实了在体外感染的猪和兔的角膜 24 h 后,细菌活细胞计数没有显著差异。这些动物模型已广泛应用于细菌性角膜炎诸多的研究。

当铜绿假单胞菌粘附于宿主表面时,细菌可以向胞外分泌粘性物质,将形成的微菌落包裹,逐渐形成生物膜^[52]。生物膜除了可以牢固粘附于宿主细胞表面之外,还可以分泌胞外聚合物和毒力因子,不但使生物膜具有自身的空间结构,保护细菌免受宿主的免疫攻击,还能改变菌体结构或表型,逃避免疫识别。生物膜特异性免疫逃避的机制包括机械保护、屏蔽免疫识别、改变基因表达和抑制免疫细胞功能^[53-55]。

铜绿假单胞菌能够分泌至少 7 种不同的蛋白酶,其中一些在角膜炎的发病机制中发挥潜在作用。例如基质金属蛋白酶,特别是弹性蛋白酶 B(Las B)和碱性蛋白酶(AP),在角膜炎中起着相当重要的作用,因为将 Las B 注射到角膜基质中会导

致严重的角膜损伤。铜绿假单胞菌小蛋白酶 (PASP) 能够破坏胶原蛋白, 其是角膜基质的主要构成部分, 因此 PASP 可能在角膜损伤中发挥重要作用。将纯化的 PASP 注射到兔角膜中, 会导致角膜上皮细胞的破坏, 并可进一步损伤基质^[56]。

Cole 等^[57] 证明 IL-6 在铜绿假单胞菌感染的角膜组织中快速上调, IL-6 基因缺陷型小鼠与野生型相比, 病程延长, 炎症反应更重, 预后更差。IL-1、IL-6 等可以趋化多核中性粒细胞 (polymorphonuclear, PMN) 向病变部位集中, 募集的 PMN 浸润于感染角膜, 引起炎症反应以清除细菌。机体抵抗铜绿假单胞菌的特异性免疫主要是由 CD4⁺ T 细胞介导。在相关的研究中表明, 倾向于 Th1 型反应的 C57BL/6 小鼠角膜感染 PA 后在感染早期即可出现角膜混浊, 角膜基质及前房有大量炎性细胞浸润, 病情较重、发展迅速, 极易导致角膜穿孔。BALB/c 小鼠更倾向于 Th2 型反应, 感染后比 C57BL/6 小鼠的病程更长, 但角膜溃疡或穿孔的发生率却明显更低^[58]。因此 Th1 和 Th2 型免疫应答的促炎与抗炎平衡对角膜炎的病程发展起到重要作用。

3.2 金黄色葡萄球菌感染及动物模型

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是细菌性角膜感染的常见原因, 其进展迅速, 导致角膜瘢痕形成、穿孔和严重的视力丧失。它在免疫功能低下、糖尿病和艾滋病患者中更常见, 使用隐形眼镜的人也更容易出现这种问题^[59]。

Hume 等^[60] 建立金黄色葡萄球菌感染角膜炎小鼠模型, 研究表明葡萄球菌蛋白酶通过增加纤维连接蛋白的结合而增加了角膜细胞的粘附和侵袭, 其抑制对金黄色葡萄球菌在角膜炎中的致病性有显著影响。不同动物的感染模型具有其局限性。例如, 使用间质内注射细菌的兔角膜炎模型技术简单、可控, 重复率高^[61], 但该模型并没有复制人类细菌性角膜炎的发展过程, 而且它绕过了感染过程中的重要步骤; 与人类的感染不同, 一些小鼠模型无需治疗就能清除感染。对小鼠角膜上皮进行清创后接种细菌^[59], 也不是人类角膜在感染前受损的最精确模型, 除非有化学或机械创伤造成的大伤口。迄今为止, 划痕模型的假单胞菌和金黄色葡萄球菌角膜炎研究中使用的模型相似^[62], 与人类角膜炎发生的情况非常接近。

使用角膜炎兔模型最重要的发现是金黄色葡萄球菌分泌的 α -溶血素是导致疾病严重程度的主要细菌毒力因子, α -溶血素免疫对金黄色葡萄球菌

角膜炎具有保护作用^[63]。兔角膜注射纯化 α -毒素可引起角膜和虹膜显著的、剂量依赖的炎症反应^[64]。这些结果在角膜划痕术后的小鼠角膜炎模型中得到了证实。Putra 等^[59] 在体外使用划痕试验和体内使用小鼠上皮清创模型证实了金黄色葡萄球菌对角膜上皮伤口愈合的抑制作用很大程度上归因于 α -溶血素。结果表明, 金黄色葡萄球菌定植的患者更容易出现角膜上皮伤口愈合延迟, 而 α -溶血素是这一过程的主要因子。在建立的小鼠金黄色葡萄球菌角膜炎也证实金黄色葡萄球菌的侵袭力依赖于 α -溶血素。此研究中使用的感染模型涉及角膜上皮细胞的彻底清创, 以促进细菌侵入基质。金黄色葡萄球菌相关 α -溶血素导致角膜上皮细胞溶解暴露底层基质, 增加中性粒细胞密度。细菌性角膜炎的角膜浸润是中性粒细胞的聚集, 其聚集是为了清除入侵的病原体及其抗原。主要是浸润的白细胞、角膜组织和角膜缘血管内皮之间的细胞间连接决定了中性粒细胞的募集^[65]。

在动物研究中, 中性粒细胞快速募集是通过激活感染部位的 Th1 细胞来驱动宿主的先天免疫应答。中性粒细胞长期募集可能会触发细胞外溶酶体酶的释放, 从而导致角膜进一步损伤。巨噬细胞炎性蛋白-2 (MIP-2), 也被称为 CXCL2, 是一个强有力的嗜中性粒细胞化学诱导物。基因敲除 (gene knockout) 和转基因小鼠角膜感染过程中炎症介质的恢复表明, 许多受体例如 CXCR2, TLR4, TLR9 与 IL-1 β 蛋白共同介导 MIP-2 的释放和活性^[66]。例如, 在小鼠研究中发现, CXCR2 受体与 MIP-2 结合是必要的, 可以有效地使中性粒细胞趋化并渗出到金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌角膜炎的部位^[67-68]。尽管在 CXCR2 敲除小鼠的角膜感染后 MIP-2 水平高, 中性粒细胞仍局限于外缘区域。CXCR2 的缺失破坏了 MIP-2 驱动的中性粒细胞迁移到感染部位, 阻碍了细菌清除, 导致角膜炎进展甚至穿孔^[67-68]。

4 总结与展望

所有的角膜炎动物模型都有其局限性。兔和小鼠, 已经被证明是研究微生物性角膜炎的有用模型。然而, 当使用具有不同于人类特征的物种时, 也存在一些缺点。大多数用作模型的小鼠都是近交系, 其优点是保证实验的一致性; 然而, 近交系动物并不像远交系动物能真实代表人类的症状。各种实验动物和人类的解剖特征、组织组成和眼部成分的各种功能差异明显。例如, 人类的角膜直径约

为 11 mm,而兔和小鼠的角膜大小分别为 13 mm 和 2.2~3.5 mm^[69-70];人类角膜厚度比兔和小鼠更大;人类眨眼的时间间隔大约是 2.8 s,而兔和小鼠眨眼的时间间隔超过 30 s^[69];兔有瞬态膜,而人类和小鼠没有;兔、小鼠和人类的角膜胶原蛋白^[69]和角膜上皮细胞^[71]的排列方式不同,这可能导致角膜对入侵的病原体产生不同的反应。同样,人类的角膜上皮基膜是由纤维组成的网状结构,类似于鸟窝,而兔的角膜上皮基膜是直而平的。所有这些解剖上的差异,以及眨眼间隔时间,都对细菌粘附和可能的入侵、对细菌酶和其他毒力因子的易感性以及泪膜中宿主防御分子的可利用性有影响。由于它们是啮齿类动物,在进化上与灵长类动物距离较远,在免疫方面也存在差异,因此在感染和发病机制上与人类显著不同^[72-73]。

即便如此,大多数动物模型都能提供有用的信息。动物模型不仅让我们了解了启动感染的过程,而且还有助于研究宿主对感染的免疫反应,这是细胞或组织培养模型中缺失的一个重要角色^[74]。通过开发和使用与生理更相关的模型,并接近病原微生物感染人眼的环境和机制,将促进对疾病的发生发展有更全面的理解。

寻找一种接近人类但成本效益适中的合适动物作为疾病研究的模型是一项长期追求的任务。由于非人灵长类模型成本太高,难以进行大规模的模型建立。所以在非人灵长类动物中寻找一种合适的、且成本较低动物模型是十分重要的。小鼠的角膜较小,且结构与人类角膜存在差异,但是由于近年来转基因小鼠发展迅速,可以用其对某些特定的因子进行研究,这个是其他的动物模型难以替代的优点。并且我们常用的 BALB/c 小鼠对细菌感染的敏感性较好,可以作为细菌性角膜炎良好的实验动物模型^[75]。而在真菌感染导致的角膜炎中,兔模型和实际情况感染中的人表现出了相同的症状,具有较好的参考价值。而且由于兔角膜相对于小鼠较大,易于观察其病变情况,所以在真菌感染角膜炎模型的建立中,兔模型有其独有的优势^[30]。而目前角膜炎动物模型中,树鼯模型得到了更多的关注。树鼯是我国自主研发的实验动物新品种,在基因组和转录组水平上比啮齿动物更接近灵长类动物^[76]。树鼯有一个非常发达的视觉系统,它的视觉功能与人类相似。从解剖学上讲,树鼯角膜的 5 层结构(角膜上皮层,前弹力层,基质层,后弹力层和角膜内皮层)、角膜厚度和形态排列等与人类的

极为相似,相似率接近 98%^[77],相比非人灵长类动物价格昂贵、繁殖周期长、研究周期长等原因,树鼯是研究角膜炎、近视弱视等视觉系统疾病发生发展机制与治疗研究的理想适合的动物。

参考文献:

- [1] Santacruz C, Linares M, Garfias Y, et al. Expression of IL-8, IL-6 and IL-1 β in tears as a main characteristic of the immune response in human microbial keratitis [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(3): 4850-4864.
- [2] Ansari Z, Miller D, Galor A. Current thoughts in fungal keratitis: diagnosis and treatment [J]. *Curr Fungal Infect Rep*, 2013, 7(3): 209-218.
- [3] Wong RL, Gangwani RA, Yu LW, et al. New treatments for bacterial keratitis [J]. *J Ophthalmol*, 2012, 2012: 831502.
- [4] Zheng X, Yamaguchi M, Goto T, et al. Experimental corneal endotheliitis in rabbit [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(2): 377-385.
- [5] Lobo AM, Agelidis AM, Shukla D. Pathogenesis of herpes simplex keratitis: The host cell response and ocular surface sequelae to infection and inflammation [J]. *Ocul Surf*, 2019, 17(1): 40-49.
- [6] Pavan-Langston D. Herpes simplex of the ocular anterior segment [J]. *Curr Clin Top Infect Dis*, 2000, 20: 298-324.
- [7] Li L, Li Z, Wang E, et al. Herpes simplex virus 1 infection of tree shrews differs from that of mice in the severity of acute infection and viral transcription in the peripheral nervous system [J]. *J Virol*, 2016, 90(2): 790-804.
- [8] 夏丽坤, 高殿文, 张劲松. 复发性单疱病毒性角膜炎实验模型的研究 [J]. *中国实用眼科杂志*, 2001, 19(9): 706-709.
- [9] Toriyama K, Inoue T, Suzuki T, et al. Necrotizing keratitis caused by acyclovir-resistant herpes simplex virus [J]. *Case Rep Ophthalmol*, 2014, 5(3): 325-328.
- [10] Niemialtowski MG, Rouse BT. Predominance of Th1 cells in ocular tissues during herpetic stromal keratitis [J]. *J Immunol*, 1992, 149(9): 3035-3039.
- [11] Thomas J, Gangappa S, Kanangat S, et al. On the essential involvement of neutrophils in the immunopathologic disease: herpetic stromal keratitis [J]. *J Immunol*, 1997, 158(3): 1383-1391.
- [12] Mott KR, Underhill D, Wechsler SL, et al. Lymphoid-related CD11c⁺ CD8 α ⁺ dendritic cells are involved in enhancing herpes simplex virus type 1 latency [J]. *J Virol*, 2008, 82(20): 9870-9879.
- [13] Bryant-Hudson KM, Carr DJ. PD-L1-expressing dendritic cells contribute to viral resistance during acute HSV-1 infection [J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 924619.
- [14] Novak N, Peng WM. Dancing with the enemy: the interplay of herpes simplex virus with dendritic cells [J]. *Clin Exp Immunol*, 2005, 142(3): 405-410.
- [15] Jin X, Qin Q, Chen W, et al. Expression of toll-like receptors in the healthy and herpes simplex virus-infected cornea [J].

- Cornea, 2007, 26(7): 847–852.
- [16] Sarangi PP, Kim B, Kurt-Jones E, et al. Innate recognition network driving herpes simplex virus-induced corneal immunopathology: role of the toll pathway in early inflammatory events in stromal keratitis [J]. J Virol, 2007, 81(20): 11128–11138.
 - [17] Takeda S, Miyazaki D, Sasaki S, et al. Roles played by toll-like receptor-9 in corneal endothelial cells after herpes simplex virus type 1 infection [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(9): 6729–6736.
 - [18] Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, et al. The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus [J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(1): 86–102.
 - [19] Zhang S, Zang Y, Lu Q, et al. Establishing an animal model of cytomegalovirus keratouveitis in rats: broad infection of anterior segment tissue by cytomegalovirus [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2021, 62(13): 22.
 - [20] Kandori M, Inoue T, Takamatsu F, et al. Prevalence and features of keratitis with quantitative polymerase chain reaction positive for cytomegalovirus [J]. Ophthalmology, 2010, 117(2): 216–222.
 - [21] Carmichael A. Cytomegalovirus and the eye [J]. Eye (Lond), 2012, 26(2): 237–240.
 - [22] Yuhasz SA, Dissette VB, Cook ML, et al. Murine cytomegalovirus is present in both chronic active and latent states in persistently infected mice [J]. Virology, 1994, 202(1): 272–280.
 - [23] Reeves M, Sinclair J. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2008, 325: 297–313.
 - [24] Angelova M, Zvezdaryk K, Ferris M, et al. Human cytomegalovirus infection dysregulates the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. PLoS Pathog, 2012, 8(10): e1002959.
 - [25] Alfawaz A. Cytomegalovirus-related corneal endotheliitis: A review article [J]. Saudi J Ophthalmol, 2013, 27(1): 47–49.
 - [26] Putturu F, Francozo M, Solmaz G, et al. Conventional dendritic cells confer protection against mouse cytomegalovirus infection via TLR9 and MyD88 signaling [J]. Cell Rep, 2016, 17(4): 1113–1127.
 - [27] Szomolanyi-Tsuda E, Liang X, Welsh RM, et al. Role for TLR2 in NK cell-mediated control of murine cytomegalovirus *in vivo* [J]. J Virol, 2006, 80(9): 4286–4291.
 - [28] Dóczy I, Gyetvai T, Kredics L, et al. Involvement of *Fusarium* spp. in fungal keratitis [J]. Clin Microbiol Infect, 2004, 10(9): 773–776.
 - [29] Pinnock A, Shivshetty N, Roy S, et al. *Ex vivo* rabbit and human corneas as models for bacterial and fungal keratitis [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2017, 255(2): 333–342.
 - [30] Aimaniananda V, Bayry J, Bozza S, et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores [J]. Nature, 2009, 460(7259): 1117–1121.
 - [31] Mukherjee PK, Chandra J, Yu C, et al. Characterization of *Fusarium keratitis* outbreak isolates: contribution of biofilms to antimicrobial resistance and pathogenesis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(8): 4450–4457.
 - [32] Raza SK, Mallet AI, Howell SA, et al. An *in-vitro* study of the sterol content and toxin production of *Fusarium* isolates from mycotic keratitis [J]. J Med Microbiol, 1994, 41(3): 204–208.
 - [33] Cusumano V, Costa GB, Seminara S. Effect of aflatoxins on rat peritoneal macrophages [J]. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(11): 3482–3484.
 - [34] Jin X, Qin Q, Tu L, et al. Toll-like receptors (TLRs) expression and function in response to inactivate hyphae of *Fusarium solani* in immortalized human corneal epithelial cells [J]. Mol Vis, 2007, 13: 1953–1961.
 - [35] 苗雨润, 贾杰, 黎晓慧, 等. 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 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(6): 752–759.
 - [36] Hoving JC, Wilson GJ, Brown GD. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity [J]. Cell Microbiol, 2014, 16(2): 185–194.
 - [37] Marakalala MJ, Graham LM, Brown GD. The role of Syk/CARD9-coupled C-type lectin receptors in immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infections [J]. Clin Dev Immunol, 2010, 2010: 567571.
 - [38] Tanure MA, Cohen EJ, Sudesh S, et al. Spectrum of fungal keratitis at Wills Eye Hospital, Philadelphia, Pennsylvania [J]. Cornea, 2000, 19(3): 307–312.
 - [39] Sun RL, Jones DB, Wilhelmus KR. Clinical characteristics and outcome of *Candida keratitis* [J]. Am J Ophthalmol, 2007, 143(6): 1043–1045.
 - [40] Clarke DW, Niederkorn JY. The pathophysiology of *Acanthamoeba keratitis* [J]. Trends Parasitol, 2006, 22(4): 175–180.
 - [41] Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, et al. Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection [J]. Eukaryot Cell, 2003, 2(5): 1053–1060.
 - [42] Sheppard DC, Filler SG. Host cell invasion by medically important fungi [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014, 5(1): a019687.
 - [43] Hardison SE, Brown GD. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity [J]. Nat Immunol, 2012, 13(9): 817–822.
 - [44] Marakalala MJ, Vautier S, Potrykus J, et al. Differential adaptation of *Candida albicans* *in vivo* modulates immune recognition by dectin-1 [J]. PLoS Pathog, 2013, 9(4): e1003315.
 - [45] del Fresno C, Soulat D, Roth S, et al. Interferon- β production via Dectin-1-Syk-IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans* [J]. Immunity, 2013, 38(6): 1176–1186.
 - [46] 邹嫣丽. 不同品系小鼠诱导实验性白色念珠菌性角膜炎的研究 [D]. 泰安: 泰山医学院, 2012.

- [47] Dutta D, Cole N, Willcox M. Factors influencing bacterial adhesion to contact lenses [J]. Mol Vis, 2012, 18: 14–21.
- [48] Wei C, Zhu M, Petroll WM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infectious keratitis in a high oxygen transmissible rigid contact lens rabbit model [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(9): 5890–5899.
- [49] Szliter EA, Morris CA, Carney F, et al. Development of a new extended-wear contact lens model in the rat [J]. CLAO J, 2002, 28(3): 119–123.
- [50] Metruccio MME, Wan SJ, Horneman H, et al. A novel murine model for contact lens wear reveals clandestine IL-1R dependent corneal parainflammation and susceptibility to microbial keratitis upon inoculation with *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Ocul Surf, 2019, 17(1): 119–133.
- [51] Okurowska K, Roy S, Thokala P, et al. Establishing a porcine *ex vivo* cornea model for studying drug treatments against bacterial keratitis [J]. J Vis Exp, 2020, 159: e61156.
- [52] Skariyachan S, Sridhar VS, Packirisamy S, et al. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal [J]. Folia Microbiol (Praha), 2018, 63(4): 413–432.
- [53] Jensen PØ, Givskov M, Bjarnsholt T, et al. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010, 59(3): 292–305.
- [54] Campoccia D, Mirzaei R, Montanaro L, et al. Hijacking of immune defences by biofilms: a multifront strategy [J]. Biofouling, 2019, 35(10): 1055–1074.
- [55] de Vor L, Rooijackers SHM, van Strijp JAG. *Staphylococci evade* the innate immune response by disarming neutrophils and forming biofilms [J]. FEBS Lett, 2020, 594(16): 2556–2569.
- [56] Lakhundi S, Siddiqui R, Khan NA. Pathogenesis of microbial keratitis [J]. Microb Pathog, 2017, 104: 97–109.
- [57] Cole N, Bao S, Willcox M, et al. Expression of interleukin-6 in the cornea in response to infection with different strains of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Infect Immun, 1999, 67(5): 2497–2502.
- [58] 王岚, 李妍, 孙子雯, 等. 铜绿假单胞菌性角膜炎发病机制的研究进展 [J]. 国际眼科杂志, 2020, 20: 1916–1919.
- [59] Putra I, Rabiee B, Anwar KN, et al. *Staphylococcus aureus* α -hemolysin impairs corneal epithelial wound healing and promotes intracellular bacterial invasion [J]. Exp Eye Res, 2019, 181: 263–270.
- [60] Hume EB, Cole N, Khan S, et al. The role of staphopain a in *Staphylococcus aureus* keratitis [J]. Exp Eye Res, 2020, 193: 107994.
- [61] O'Callaghan RJ. The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* eye infections [J]. Pathogens, 2018, 7(1): 9.
- [62] Kwon B, Hazlett LD. Association of CD4⁺ T cell-dependent keratitis with genetic susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* ocular infection [J]. J Immunol, 1997, 159(12): 6283–6290.
- [63] Marquart ME. Animal models of bacterial keratitis [J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011: 680642.
- [64] O'Callaghan RJ, Callegan MC, Moreau JM, et al. Specific roles of α -toxin and β -toxin during *Staphylococcus aureus* corneal infection [J]. Infect Immun, 1997, 65(5): 1571–1578.
- [65] Hazlett LD. Corneal response to *Pseudomonas aeruginosa* infection [J]. Prog Retin Eye Res, 2004, 23(1): 1–30.
- [66] Shrestha GS, Vijay AK, Stapleton F, et al. Understanding clinical and immunological features associated with *Pseudomonas* and *Staphylococcus keratitis* [J]. Cont Lens Anterior Eye, 2021, 44(1): 3–13.
- [67] Cole N, Hume EB, Khan S, et al. The role of CXCL chemokine receptor 2 in *Staphylococcus aureus* keratitis [J]. Exp Eye Res, 2014, 127: 184–189.
- [68] Huang X, Barrett RP, McClellan SA, et al. Silencing Toll-like receptor-9 in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(11): 4209–4216.
- [69] Hayes S, Boote C, Lewis J, et al. Comparative study of fibrillar collagen arrangement in the corneas of primates and other mammals [J]. Anat Rec (Hoboken), 2007, 290(12): 1542–1550.
- [70] Henriksson JT, McDermott AM, Bergmanson JP. Dimensions and morphology of the cornea in three strains of mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(8): 3648–3654.
- [71] Jester JV, Budge A, Fisher S, et al. Corneal keratocytes: phenotypic and species differences in abundant protein expression and *in vitro* light-scattering [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(7): 2369–2378.
- [72] Dasgupta G, BenMohamed L. Of mice and not humans: how reliable are animal models for evaluation of herpes CD8⁺-T cell-epitopes-based immunotherapeutic vaccine candidates? [J]. Vaccine, 2011, 29(35): 5824–5836.
- [73] Stuart PM, Keadle TL. Recurrent herpetic stromal keratitis in mice: a model for studying human HSK [J]. Clin Dev Immunol, 2012, 2012: 728480.
- [74] Astley RA, Coburn PS, Parkunan SM, et al. Modeling intraocular bacterial infections [J]. Prog Retin Eye Res, 2016, 54: 30–48.
- [75] Maksimenko OG, Deykin AV, Khodarovich YM, et al. Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems [J]. Acta Naturae, 2013, 5(1): 33–46.
- [76] Fan Y, Yu D, Yao YG. Tree shrew database (TreeshrewDB): a genomic knowledge base for the Chinese tree shrew [J]. Sci Rep, 2014, 4: 7145.
- [77] Almubrad T, Akhtar S. Structure of corneal layers, collagen fibrils, and proteoglycans of tree shrew cornea [J]. Mol Vis, 2011, 17: 2283–2291.

[收稿日期] 2021-05-27