

树鼩细菌性角膜炎感染模型的建立及 IL-17 在模型中的表达

王 岚¹, 李 妍¹, 孙子雯², 李玉婷¹, 胡竹林¹

引用:王岚,李妍,孙子雯,等. 树鼩细菌性角膜炎感染模型的建立及 IL-17 在模型中的表达. 国际眼科杂志 2022;22(1):22-27

基金项目:云南省基础研究计划(No.2018FE001-265);云南省应用基础研究(昆医联合专项)项目(No.202001AY070001-165)
作者单位:¹(650021)中国云南省昆明市,云南大学附属医院眼科 云南省第二人民医院眼科 昆明医科大学第四附属医院眼科 云南省眼科医院 云南省眼科研究所 云南省眼部疾病临床医学研究中心 云南省眼病临床医学中心 云南省眼科疾病防治重点实验室;²(300041)中国天津市,天津医科大学眼科医院 眼视光学院 眼科研究所 天津市眼科学与视觉科学国际联合研究中心

作者简介:王岚,女,毕业于昆明医科大学,硕士,研究方向:眼表疾病、角膜病。

通讯作者:胡竹林,男,毕业于华中科技大学,博士,主任医师,眼科主任,硕士、博士研究生导师,研究方向:眼表疾病、角膜病、眼科疑难疾病. HZL77@263.net

收稿日期:2021-06-23 修回日期:2021-12-02

摘要

目的:建立树鼩铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌性角膜炎感染模型,并观察 IL-17 在模型中的表达,初步探讨 IL-17 在树鼩细菌性角膜炎中的作用。

方法:采用接触镜辅助的角膜划痕法建立树鼩细菌性角膜炎模型。在进行接种后第 1、4、7、14d 使用前段照相、活体共聚焦显微镜对模型感染症状进行评估,制作病理切片观察角膜组织病理学改变。在相应时间点进行取材,实时荧光定量 PCR 检测树鼩角膜组织中 IL-17 mRNA 的表达,ELISA 检测 IL-17 蛋白表达水平。

结果:树鼩铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌性角膜炎模型造模成功率为 96%、100%,树鼩细菌性角膜炎临床表现、炎症细胞浸润情况和组织病理改变规律相吻合。IL-17 基因和蛋白的表达情况在树鼩角膜中与角膜炎的严重程度一致。

结论:采用接触镜辅助的角膜划痕法可成功建立更接近人细菌性角膜炎自然感染病程的树鼩铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌性角膜炎动物模型。IL-17 参与树鼩细菌性角膜炎发生发展的过程。

关键词:角膜炎;铜绿假单胞菌;金黄色葡萄球菌;树鼩;白介素-17

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2022.1.04

Establishment of experimental bacterial keratitis in a tree shrew infection model and expression of interleukin - 17 in the model

Lan Wang¹, Yan Li¹, Zi-Wen Sun², Yu-Ting Li¹, Zhu-Lin Hu¹

Foundation items: Yunnan Province Basic Research Program (No.

2018FE001-265); Applied Basic Research of Yunnan Province-Kunming Medical University Joint Project (No.202001AY070001-165)

¹Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Yunnan University; The Second People's Hospital of Yunnan Province; Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University; Yunnan Eye Hospital; Yunnan Eye Institute; The Ocular Disease and Clinical Medicine Research Center of Yunnan Province; The Ocular Disease Clinical Medicine Center of Yunnan Province; Key Laboratory of Yunnan Province for the Prevention and Treatment of Ophthalmology, Kunming 650021, Yunnan Province, China; ²Eye Institute and School of Optometry; Tianjin Medical University Eye Hospital; Tianjin International Joint Research and Development Centre of Ophthalmology and Vision Science, Tianjin 300041, China
Correspondence to: Zhu-Lin Hu. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Yunnan University; The Second People's Hospital of Yunnan Province; Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University; Yunnan Eye Hospital; Yunnan Eye Institute; The Ocular Disease and Clinical Medicine Research Center of Yunnan Province; The Ocular Disease Clinical Medicine Center of Yunnan Province; Key Laboratory of Yunnan Province for the Prevention and Treatment of Ophthalmology, Kunming 650021, Yunnan Province, China. HZL77@263.net

Received: 2021-06-23 Accepted: 2021-12-02

Abstract

• **AIM:** To establish the model of pseudomonas aeruginosa and staphylococcus aureus keratitis infection in tree shrews. To determine the expression of IL-17 in the bacterial infection process of tree shrews cornea, and the mechanism of IL-17 in bacterial keratitis of tree shrews is discussed.

• **METHODS:** The tree shrew bacterial keratitis models were established by the contact lens-assisted corneal scratching method. After establishing models successfully, the infection symptoms of the model were evaluated by using anterior segment photography and *in vivo* confocal microscopy on 1, 4, 7 and 14d after performing inoculation, and pathological sections were made to observe histopathological changes in the cornea. Samples were collected at the corresponding time points above, and the expression of IL-17 mRNA in the corneal tissues of tree shrews was detected by real-time quantitative PCR, and the expression of IL-17 protein was detected by ELISA.

• **RESULTS:** The success rate of modeling the tree shrew pseudomonas aeruginosa and staphylococcus aureus keratitis models was 96% and 100%. The clinical manifestations and inflammatory cell infiltration of the tree shrew keratitis was consistent with the changing rules of the cornea in histopathological. IL-17 gene and protein expression profiles in tree shrew corneas were consistent with the severity of corneal inflammation basically.

• **CONCLUSION:** The use of contact lens-assisted corneal scratching method can successfully establish animal models of pseudomonas aeruginosa and staphylococcus

aureus keratitis in tree shrews that more closely resemble the natural course of human bacterial keratitis infection. IL-17 participated in the occurrence and development of bacterial keratitis in tree shrews.

• **KEYWORDS:** keratitis; pseudomonas aeruginosa; staphylococcus aureus; tree shrew; interleukin-17

Citation: Wang L, Li Y, Sun ZW, et al. Establishment of experimental bacterial keratitis in a tree shrew infection model and expression of interleukin-17 in the model. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(1):22-27

0 引言

细菌性角膜炎 (bacterial keratitis, BK) 是临床最常见的角膜炎之一,铜绿假单胞菌 (*pseudomonas aeruginosa*, PA) 和金黄色葡萄球菌 (*staphylococcus aureus*, SAU) 是 BK 的常见病原菌^[1-3],可极具破坏性地造成角膜组织损伤,并且易导致角膜瘢痕形成和角膜新生血管形成等后遗症出现,造成视力永久性损伤。因此研究其发病机制,开发有效药物就显得尤为重要。白介素-17 (interleukin-17, IL-17) 是抵抗多种微生物,尤其是细胞外细菌和真菌的关键因子^[4]。多项临床及基础研究表明 IL-17 参与了角膜炎的发生发展,但 IL-17 在角膜炎反应中发挥保护作用还是破坏作用取决于感染的病原微生物和宿主的类型^[5-6]。建立稳定、具有代表性的动物模型,可以加快基础研究发展的速度。本研究采用近年来研究眼科疾病新兴的实验动物树鼩 (tree shrew) 构建铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌性角膜炎动物模型,并关注 IL-17 在树鼩角膜炎模型发生发展中的表达情况,初步探讨 IL-17 在 BK 感染免疫中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康树鼩 6~12 月龄 72 只,雌雄兼用,体质量 120±10g,由昆明医科大学实验动物学部提供 [SCXK (滇)K2020-0004],动物实验地点为昆明医科大学实验室 [SYXK (滇)K2020-0006],所有操作符合昆明医科大学实验动物伦理学要求 [伦理审批号:KMMU2020175]。

1.1.2 实验菌株 铜绿假单胞菌标准菌株 (ATCC27853)、金黄色葡萄球菌标准菌株 (ATCC29523) 由云南大学附属医院检验科提供,购于美国 ATCC 公司。

1.1.3 试剂与仪器 胰酪大豆胨液体培养基 (TSB; Solarbio, 北京),胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA; Solarbio, 北京),冷冻高速离心机 (Heraeus, 德国),前段照相机 (Topcon, 日本),共聚焦激光角膜显微镜 (HRT, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 细菌悬液制备 将活化后 PA、SAU 标准菌株接种于 TSA 平板,置于 37℃ 培养箱中避光培养 24~48h,分别挑取 PA、SAU 单菌落至 TSB 培养液中,置于 37℃ 恒温摇床,180r/min 转速下,振荡培养 24h。取菌悬液在室温下,以 7 500r/min 转速,离心 5min,弃上清并用 PBS 重悬,用细菌计数板计数,调节菌浓度至 1×10⁹CFU/mL。

1.2.2 动物模型的建立 均选取树鼩右眼作为实验眼,并在实验前检查,证实无眼前节疾病。72 眼随机分为 3 组,PA 组、SAU 组和生理盐水对照组,每组各 24 眼。模型组树鼩使用 3% 戊巴比妥钠 (2mL/kg) 腹腔注射麻醉后,碘伏常规消毒术眼 3 遍,铺一次性洞巾,盐酸奥布卡因眼液点术眼,行表面麻醉。待麻醉生效后,使用 5mm 环钻定位于角膜中央,轻压环钻,在角膜表面形成压痕,在压痕内使用 30G 针头在角膜表面制造“#”字型划痕。分别吸取 5μL

PA 菌悬液和 SAU 菌悬液 (1×10⁹CFU/mL) 滴于划痕处,待角膜表面菌液稍干燥后,覆盖制备好的隐形眼镜于角膜表面。使用 5-0 丝线缝合睑缘。对照组操作步骤中除将滴加菌悬液 5μL 改为等量生理盐水外,其余步骤同模型组。术后 24h 拆除缝线,观察造模情况。

1.2.3 感染症状观察 使用眼科裂隙灯行前段检查,观察感染症状。使用眼表活体共焦显微镜观察角膜组织炎症细胞浸润情况。观察时间点为:接种细菌后第 1、4、7、14d。

1.2.4 组织病理学检查 在接种细菌后第 1、4、7、14d 随机选取模型组和对照组树鼩,每组每个时间点过量麻醉处死 3 只树鼩,在无菌环境下摘取角膜,制作石蜡切片。行苏木素-伊红 (HE) 染色后,观察角膜组织的病理改变。

1.2.5 感染菌鉴定 将成功感染的树鼩麻醉,用无菌手术刀片刮取病灶周围组织,细菌培养后使用 CTAB 法^[7]对细菌 DNA 提取,进行 DNA 扩增测序后鉴定感染菌种,确定角膜炎模型是否建立成功。

1.2.6 检测 IL-17 在树鼩 BK 模型中的表达 造模后第 1、4、7、14d 各时间点对模型组和对照组树鼩角膜进行取材,每个时间点每组处死 3 只树鼩,实时荧光定量 PCR 检测 IL-17 mRNA 相对表达量,ELISA 检测 IL-17 蛋白表达。树鼩 IL-17 及内参 GAPDH 基因引物序列见表 1。

统计学分析:采用软件 SPSS24.0 进行分析,计量资料符合正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表达,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裂隙灯检查结果 对照组树鼩在角膜损伤后可见划痕处角膜上皮缺损,并未见炎症反应。第 7d 时上皮已完全再生,角膜完全恢复透明。模型组树鼩在裂隙灯下观察,感染 1d 后已出现角膜水肿、炎性渗出及基质混浊。感染 4d 后,角膜浸润加重,范围扩大至全角膜。感染 7d 后,周围角膜水肿较前减轻,病灶逐渐局限,脓性分泌减少。感染 14d 后,炎症进一步减轻,角膜上皮逐渐修复,周围角膜开始恢复透明 (图 1)。

2.2 共聚焦显微镜检查结果 共聚焦检查结果显示,对照组树鼩角膜仅有上皮组织结构稍有改变,基质层及内皮层组织结构完整,细胞形态正常。第 7d 时上皮缺损已完全修复。在共聚焦显微镜下,模型组树鼩角膜感染后 1d,角膜上皮可见炎性细胞浸润,结构不清。感染后 4d,基质层可见大量的炎症细胞聚集,形成块状的高反光区坏死区域。感染后 7d,炎症细胞浸润减轻,高反光区域减少。14d 时角膜上皮开始进行修复,仅见少量的炎症细胞反光影,可重见角膜上皮细胞 (图 2)。

2.3 组织病理学检查结果 对照组树鼩在角膜损伤后 1d,可在划痕损伤部位见角膜上皮脱落。损伤后第 4d,角膜逐渐修复,仍可看见划痕部分的上皮细胞缺损。第 7d,角膜上皮层已趋于平整,但上皮细胞仅生长 1~2 层。第 14d,在 HE 染色下可见角膜上皮具有完整的结构和正常的细胞形态,角膜各层连接紧密。模型组树鼩感染后 1d 的角膜组织 HE 染色可见角膜上皮缺如,炎症细胞募集于角膜基质。感染后 4d,基质层炎症细胞有更广范围的浸润,以中性粒细胞为主,并且角膜组织肿胀明显,SAU 组树鼩角膜甚至出现纤维性渗出、细胞坏死,形成溃疡灶。感染后 7d,炎症细胞的数量已减少,角膜上皮开始生长修复。感染后 14d 角膜上皮基本修复,但基质内仍有少量炎症细胞和坏死组织,且易形成瘢痕 (图 3)。

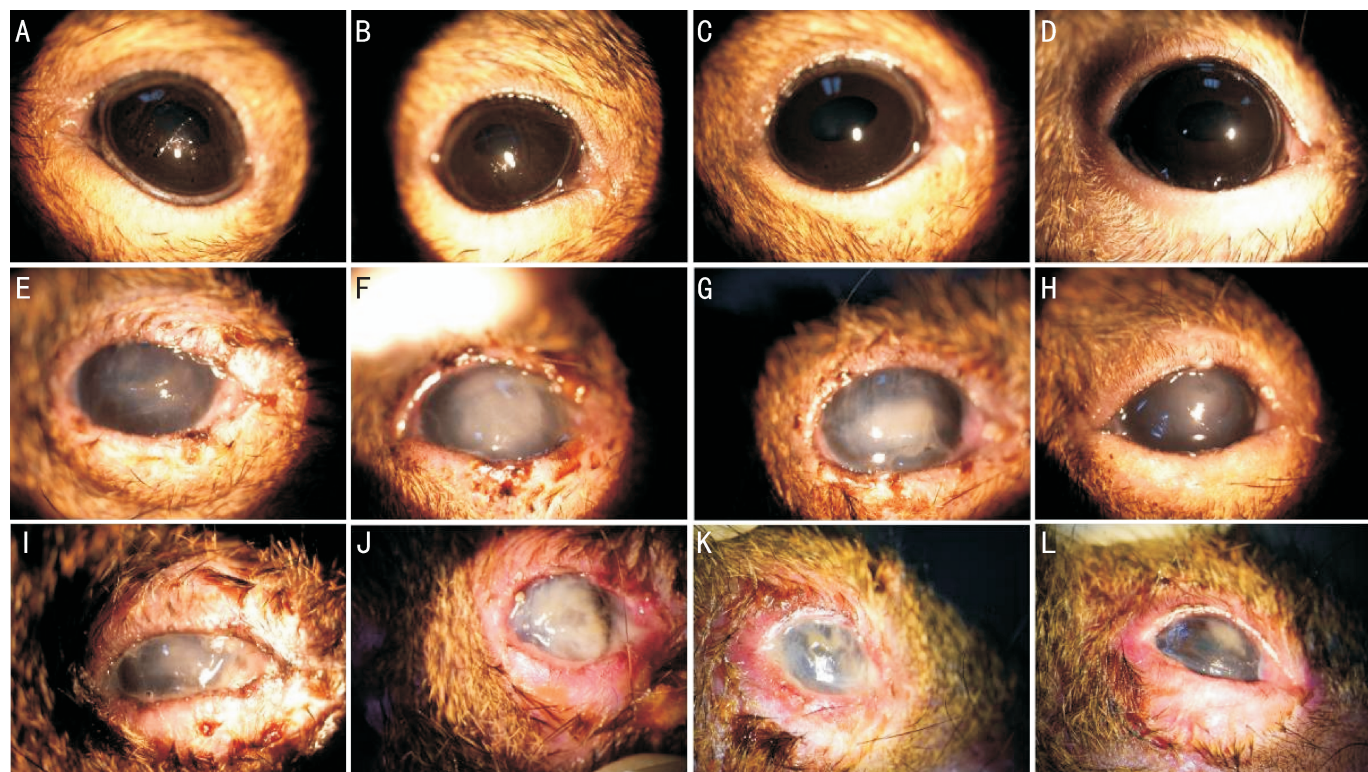


图1 裂隙灯检查结果($\times 16$) A、B、C、D分别为对照组树鼯角膜损伤后1、4、7、14d的前段照相图片;E、F、G、H分别为PA组树鼯感染后1、4、7、14d的前段照相图片;I、J、K、L分别为SAU组树鼯感染后1、4、7、14d的前段照相图片。

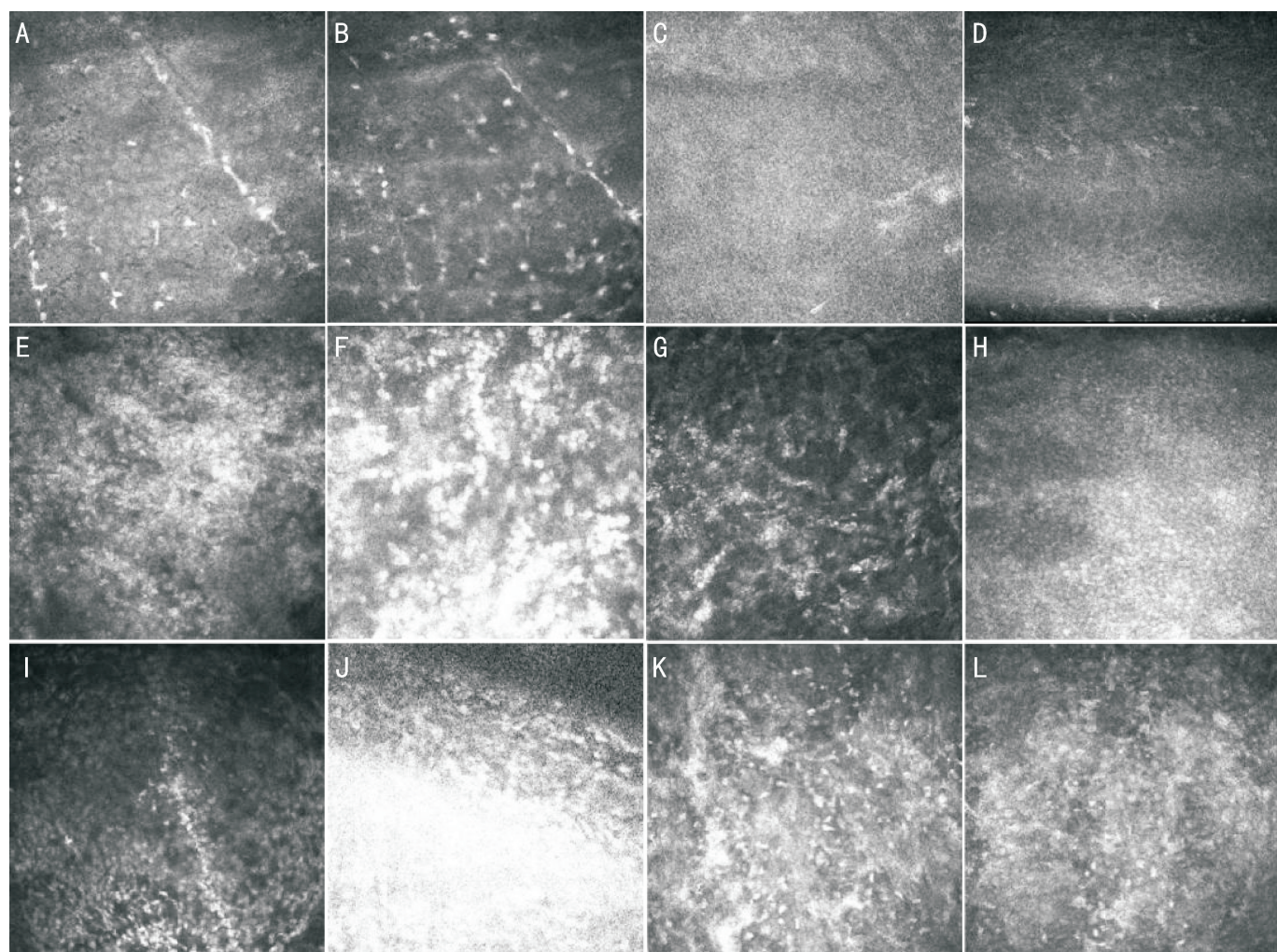


图2 角膜组织活体共聚焦检查($\times 800$) A、B、C、D分别为对照组树鼯角膜损伤后1、4、7、14d共聚焦显微镜下的表现;E、F、G、H分别为PA组树鼯角膜感染后1、4、7、14d共聚焦显微镜下的表现;I、J、K、L分别为SAU组树鼯角膜感染后1、4、7、14d共聚焦显微镜下的表现。

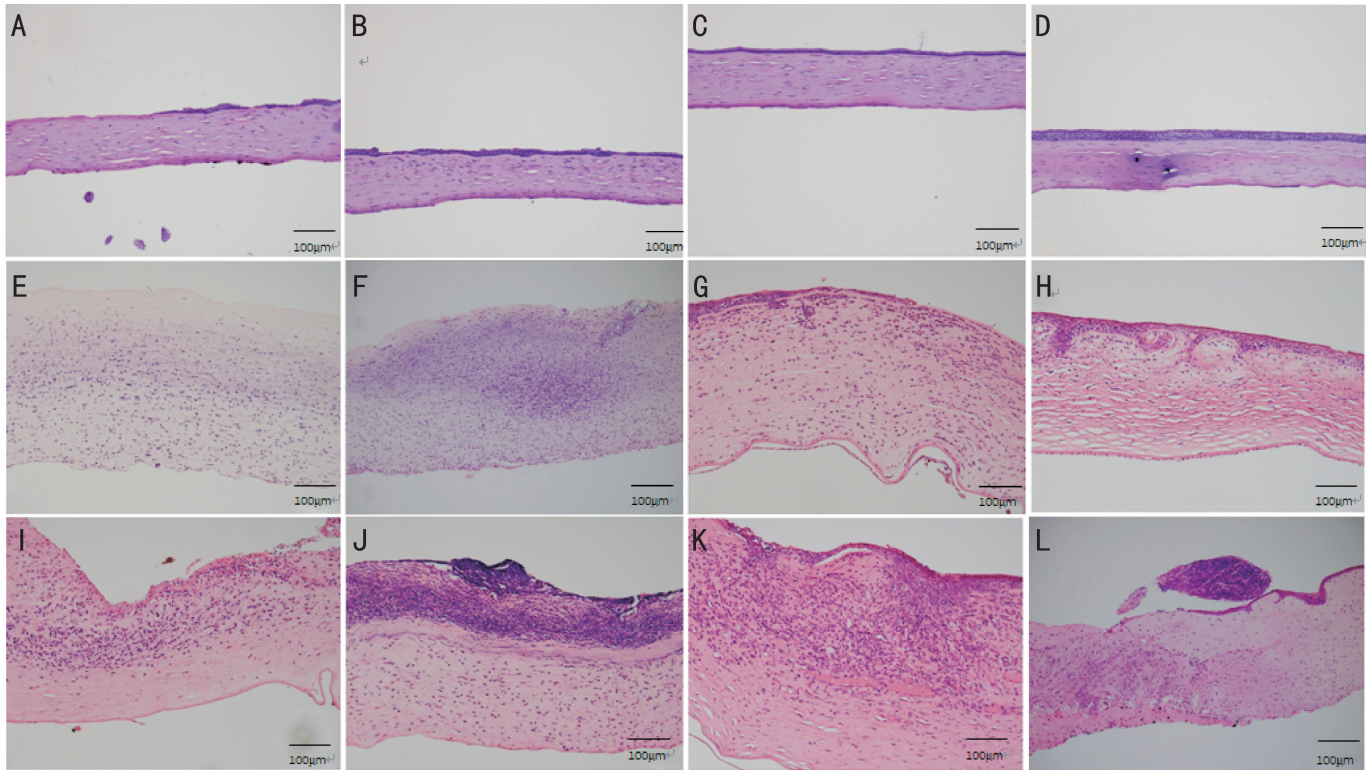


图3 角膜病理切片 A、B、C、D 分别为对照组树鼯角膜损伤后 1、4、7、14d 的 HE 染色结果;E、F、G、H 分别为 PA 组树鼯角膜感染后 1、4、7、14d 的 HE 染色结果;I、J、K、L 分别为 SAU 组树鼯角膜感染后 1、4、7、14d 的 HE 染色结果。

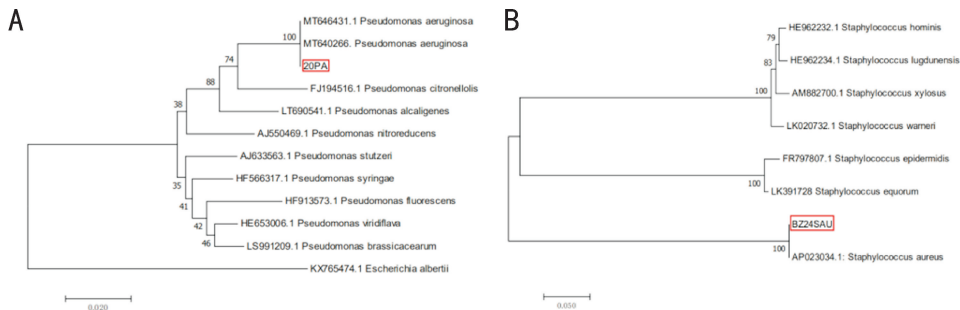


图4 模型组测序样本的基因系统发育树 A:PA 组;B:SAU 组。

表1 引物序列

检测因子	引物探针	引物序列	产物大小 (bp)
IL-17	IL-17-F	GAGGACAGGAAGCTTCCCCCA	198
	IL-17-R	CCCTTCAGCATCCACACAGC	
GAPDH	GAPDH-F	GATCCCGCCAACATCAAAA	166
	GAPDH-R	TCACGCCCATCACAACA	

2.4 菌种鉴定 模型组树鼯角膜组织进行细菌培养后提取 DNA 并进行扩增测序。将测序样本的 DNA 与 NCBI 数据库中 DNA 序列进行比对,并使用 MEGA7 软件构建基因系统发育树。比对结果显示 PA 组测序样本属于假单胞杆菌属,与 PA 的同源性为 100%(图 4A),SAU 组建立的系统发育树也证实了该菌与 SAU 的 DNA 有 100%的相似性(图 4B)。DNA 鉴定结果表明 PA 模型组和 SAU 模型组树鼯感染的病原微生物与所接种的菌种一致。

2.5 感染成功率 PA 组 24 只实验眼仅有 1 眼未出现角膜炎临床表现,并且刮取角膜组织未见微生物生长,其余 23 只实验眼均可见 PA 感染病灶,造模成功率为 96%。SAU 组所有实验眼均可观察到明显的角膜感染症状,造模成功率为 100%。

2.6 IL-17 在树鼯 BK 模型中的表达 QPCR 结果表明,对照组各时间点 IL-17 mRNA 相对表达量未见明显变化,差异均无统计学意义($P>0.05$)。感染后第 1d,SAU 组和 PA 组的 IL-17 mRNA 表达增强,与对照组相比差异均有统计学意义($P<0.05$)。第 4d,两个模型组的 IL-17 mRNA 表达明显增强,与对照组相比差异均有统计学意义($P<0.01$)。感染后第 7d,SAU 组和 PA 组的表达量较前减少($P<0.01$),到 14d 时继续降低,降至与感染初期水平相似,与对照组相比差异均有统计学意义($P<0.05$)。比较相同时间点 SAU 组与 PA 组角膜 IL-17 mRNA 的表达量,除了感染后第 4d SAU 组的表达量高于 PA 组,差异有统计学意义($P<0.01$),其余各时间点两组间的差异均无统计学意义($P>0.05$)。SAU 组内各时间点两两比较,除了

表2 三组树鼩不同时间点角膜 IL-17 mRNA 相对表达量 $\bar{x} \pm s$

组别	感染后 1d	感染后 4d	感染后 7d	感染后 14d
PA 组	3.26±0.50	15.63±5.12	5.65±2.81	2.79±1.32
SAU 组	2.67±1.03	28.30±3.25	7.94±1.41	3.21±1.50
对照组	1.69±0.57	1.07±0.42	0.75±0.30	0.35±1.23

表3 三组树鼩不同时间点角膜 IL-17 蛋白表达量

组别	感染后 1d	感染后 4d	感染后 7d	感染后 14d
PA 组	25.40±2.79	41.42±4.45	20.38±1.73	16.83±1.70
SAU 组	23.41±2.40	40.20±3.22	21.81±2.65	18.48±2.05
对照组	11.40±1.00	8.22±1.03	8.08±0.91	7.01±0.79

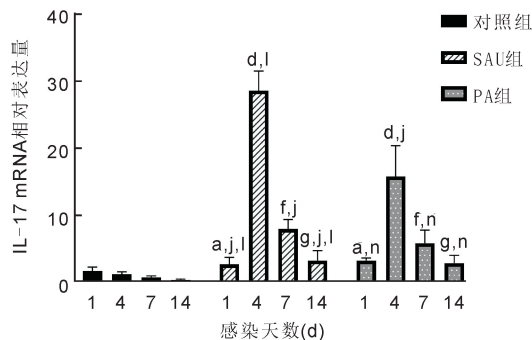


图5 不同组别树鼩角膜 IL-17 mRNA 的表达 ^a $P < 0.05$ vs 对照组 1d; ^d $P < 0.01$ vs 对照组 4d; ^f $P < 0.01$ vs 对照组 7d; ^e $P < 0.05$ vs 对照组 14d; ^j $P < 0.01$ vs SAU 组 4d; ^l $P < 0.01$ vs SAU 组 7d; ⁱ $P < 0.01$ vs PA 组 4d。

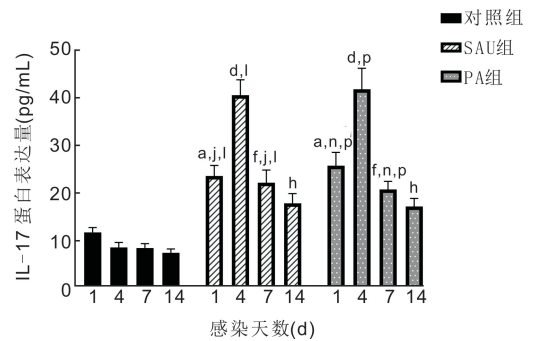


图6 不同组别树鼩角膜 IL-17 蛋白的表达量 ^a $P < 0.01$ vs 对照组 1d; ^d $P < 0.01$ vs 对照组 4d; ^f $P < 0.01$ vs 对照组 7d; ^e $P < 0.01$ vs 对照组 14d; ^j $P < 0.01$ vs SAU 组 4d; ^l $P < 0.01$ vs SAU 组 14d; ⁱ $P < 0.01$ vs PA 组 4d; ^p $P < 0.01$ vs PA 组 14d。

第 1、14d IL-17mRNA 表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其余各时间点间的差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。PA 组, 除第 4d 所呈现的较高的 IL-17 mRNA 表达量与第 1、7、14d 有显著差异 ($P < 0.01$), 其余各时间点间的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2, 图 5。

ELISA 检测的 SAU 组和 PA 组角膜 IL-17 蛋白浓度变化趋势一致, 感染后 1d, IL-17 蛋白表达升高, 感染后第 4d 达到高峰, 随后表达量降低, 整个病程中, 两个模型组 IL-17 蛋白浓度均明显高于对照组 ($P < 0.01$), 相同时间点 SAU 组与 PA 组角膜 IL-17 蛋白浓度间的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。SAU 组内各时间点两两比较, 除了第 1、7d IL-17 蛋白浓度差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其余各时间点间的差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。PA 组内各时间点两两比较与 SAU 组相似, 除了第 1、7d IL-17 蛋白浓度差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其余各时间点间的差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 3, 图 6。

3 讨论

目前用于研究角膜炎的动物模型种类较多, 但寻找一种生理病理状态更接近人类的实验动物, 对于研究角膜炎发病机制、治疗靶点和药物研究则更有意义^[8]。树鼩与人的亲缘关系较近, 并且角膜组织结构完整, 各层在角膜总厚度的占比也与人类非常相似^[9], 研究角膜疾病比兔和鼠更具有优势, 是建立角膜炎的理想动物模型^[10-11]。目前已有学者利用树鼩成功建立了真菌性和病毒性角膜炎模型^[12-14], 但至今未见有细菌性的树鼩角膜炎动物模型。本实验选择细菌性角膜炎中较为常见且破坏性强的 PA 和 SAU 作为感染菌株, 树鼩作为造模动物构建细菌性角膜炎模型。

本次研究两个模型组成功感染的树鼩中除了 SAU 组有 1 眼出现了角膜穿孔, PA 组有 1 眼未感染成功, 其余的都呈现完整的病程发展和转归。感染后的临床表现与活体共聚焦显微镜检查、病理组织学结果相符。SAU 组和 PA 组虽然在临床表现上稍有不同, 但是总体趋势相同。感染后 1d 的树鼩呈现出角膜水肿, 浅基质层有炎性浸润。随

后炎症反应逐渐增强, 感染第 4d 病情最为严重, 角膜混浊加重, 炎性渗出增多, 共聚焦显微镜检查可见大量炎症细胞聚集, 角膜结构被破坏, 病理切片结果表明角膜组织肿胀明显, 炎细胞浸润至全基质层。树鼩感染 7d 时, 角膜炎反应开始消退, 炎症细胞减少, 角膜上皮从周围向中央快速进行重构, 第 14d 角膜大部分已逐渐透明, 可见虹膜和瞳孔, HE 染色可见角膜上皮已基本修复, 共聚焦显微镜检查也重见角膜组织结构。从病理切片中观察到, 树鼩细菌性角膜炎发生时, 炎症细胞主要以中性粒细胞为主, 其中第 4d 为炎症高峰期, 中性粒细胞数量最多, 且聚集于变性坏死组织周围, 与临床表现相符。这与树鼩真菌性角膜炎的情况类似^[12, 15], 但不同的是, 树鼩角膜感染镰刀菌后期可见单核细胞及巨噬细胞, 而在本研究中, 模型组整个病程都为中性粒细胞浸润, 即使进入愈合期, 也少见单核细胞和巨噬细胞。这可能是树鼩对真菌和细菌的易感性不同, 启动的免疫机制有所不同或启动时间存在差异。

IL-17 是固有免疫和适应性免疫之间的桥梁^[16], 可发挥多种作用。在 Taylor 等^[5]的研究中, 小鼠真菌性角膜炎的保护性免疫与 IL-17 有关。小鼠感染曲霉菌和镰刀菌 48h 后, 角膜感染临床表现最为严重, ELISA 结果也显示 IL-17 在感染后 48h 表达量最高, 后续实验中, 采用抗 IL-17 治疗的小鼠角膜未检测出 IL-17, 并且角膜混浊比未接种中和抗体的小鼠更为严重。然而 Me 等^[17]和 De Winter 等^[18]的研究都证明在小鼠铜绿假单胞菌性角膜炎模型中, 在炎症高峰对 IL-17 进行阻断, 角膜病理损伤可减轻, 中性粒细胞浸润和细菌负荷量减少, 证明了 IL-17 发挥了病理作用。在我们的研究中, IL-17 的表达水平与树鼩角膜感染严重程度呈正相关, 这一表达趋势与小鼠细菌和真菌性角膜炎的相关研究相似。但 IL-17 在树鼩 BK 中介导组织损伤还是保护性免疫无法确定。在本实验中 IL-17 的表达在 PA 和 SAU 组均无统计学意义。即在我们的实验条件下, 树鼩角膜感染 SAU 和 PA 后, IL-17 在 BK

的发生发展所起的作用可能具有相似性,为探讨 IL-17 在 BK 中所起的具体作用提供了理论依据。

本实验的不足之处在于虽然 SAU 组和 PA 组成功感染的树鼩到观察终点病情都趋于好转,但观察期太短,在后续实验中可延长观察时间,以期能更好地观察完整的病程。并且仅研究了 IL-17 在树鼩 BK 中的表达情况,下一阶段可进一步研究 IL-17 的细胞来源及 IL-17 参与树鼩 BK 的具体作用机制。

本研究发现树鼩对 PA,SAU 易感,在未使用免疫抑制剂的情况下,仅使用划痕法即可建立高感染率的角膜炎模型。该模型建立方法难度适中,具有较高可重复性,是开展铜绿假单胞菌性角膜炎和金黄色葡萄球菌性角膜炎基础研究的良好模型。与此同时,IL-17 参与树鼩金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌性角膜炎发生发展的过程。但还需明确 IL-17 在树鼩角膜抗菌免疫中所起其具体作用是快速启动炎症反应清除细菌控制感染,还是放大炎症效应,造成组织感染。

参考文献

- 1 Grandi G, Bianco G, Boattini M, et al. Bacterial etiology and antimicrobial resistance trends in ocular infections; a 30-year study, Turin area, Italy. *Eur J Ophthalmol* 2021;31(2):405-414
- 2 乔秀莲,段羽,周传奇,等. 细菌性角膜炎病原学分析. *医学检验与临床* 2019;30(2):60-62
- 3 Sun X, Wang Z, Luo S, et al. Distribution and shifting trends of the pathogens for bacterial keratitis. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2002;38(5):292-294
- 4 Chen K, Kolls JK. Interleukin-17A (IL17A). *Gene* 2017;614:8-14
- 5 Taylor PR, Leal SM, Sun Y, et al. Aspergillus and Fusarium corneal infections are regulated by Th17 cells and IL-17-producing neutrophils. *J Immunol* 2014;192(7):3319-3327

- 6 Zaidi TS, Zaidi T, Pier GB, et al. Topical neutralization of interleukin-17 during experimental Pseudomonas aeruginosa corneal infection promotes bacterial clearance and reduces pathology. *Infect Immun* 2012;80(10):3706-3712
- 7 郝敏,刘占英,杨天舒. 细菌基因组 DNA 提取方法概述. *生物学通报* 2014;49(3):4-6
- 8 晏聃,张慧,马林昆. 细菌性角膜炎动物模型制备. *国际眼科纵览* 2017;41(3):198-203
- 9 Almubrad T, Akhtar S. Structure of corneal layers, collagen fibrils, and proteoglycans of tree shrew cornea. *Mol Vis* 2011;17:2283-2291
- 10 Fan Y, Ye MS, Zhang JY, et al. Chromosomal level assembly and population sequencing of the Chinese tree shrew genome. *Zool Res* 2019;40(6):506-521
- 11 贾杰,代解杰. 树鼩在生物医学研究中的优势与挑战. *实验动物与比较医学* 2019;39(1):3-8
- 12 李妍,代解杰,孙晓梅,等. 茄病镰刀菌性角膜炎树鼩模型的建立. *中国实验动物学报* 2017;25(4):420-424
- 13 Jia J, Wang W, Kuang D, et al. mRNA profiling reveals response regulators of decreased fungal keratitis symptoms in a tree shrew model. *Gene* 2020;737:144450
- 14 李丽红. 单纯疱疹病毒潜伏感染树鼩模型的建立及其鉴定. 吉林大学 2015
- 15 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. *中国实验动物学报* 2018;26(6):752-759
- 16 Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6(11):1123-1132
- 17 Me R, Gao N, Dai C, et al. IL-17 promotes Pseudomonas aeruginosa keratitis in C57BL/6 mouse corneas. *J Immunol* 2020;204(1):169-179
- 18 De Winter F, Jongers B, Bielen K, et al. Mechanical ventilation impairs IL-17 cytokine family expression in ventilator-associated pneumonia. *Int J Mol Sci* 2019;20(20):5072