

肠道真菌菌群失调对小鼠角膜创伤修复的影响

贾路路¹, 路顶立¹, 刘素素¹, 陈雨晴¹, 李志杰^{1,2}, 王丽娅¹

引用:贾路路,路顶立,刘素素,等. 肠道真菌菌群失调对小鼠角膜创伤修复的影响.国际眼科杂志 2019;19(5):724-728

基金项目:国家自然科学基金河南联合基金重点支持项目(No. U1704283);国家自然科学基金面上项目(No.81670827);郑州市人才队伍建设计划—科技创新团队(No.131PCXTD620);河南省科技发展计划(No.20150213)

作者单位:¹(450003)中国河南省郑州市,郑州大学人民医院 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所 河南省人民医院眼科 河南省眼科学与视觉科学重点实验室;²(510632)中国广东省广州市,暨南大学医学院眼科研究所 暨南大学再生医学教育部重点实验室

作者简介:贾路路,在读硕士研究生,研究方向:角膜及眼表疾病。

通讯作者:王丽娅,主任医师,教授,研究方向:角膜及眼表疾病. wangliya_55@126.com

收稿日期:2018-11-06 修回日期:2019-04-03

摘要

目的:观察抗真菌药物诱导的肠道真菌菌群失调对小鼠角膜创伤修复的影响。

方法:选用健康无眼疾的 C57BL/6J 雄性小鼠,将实验小鼠随机分为两组:对照组和两性霉素 B 组。对照组给予正常饮食,两性霉素 B 组给予添加两性霉素 B 的饮食,以诱导小鼠肠道真菌菌群失调,4wk 后对两组小鼠角膜进行上皮创伤,使用荧光素钠染色角膜创伤区域,动态观察上皮修复情况,并利用免疫荧光染色观察角膜上皮细胞、炎症细胞变化,通过 HE 染色观察角膜厚度的变化。

结果:两性霉素 B 组与对照组相比,再上皮化速度和创伤修复延迟,炎症细胞明显减少,角膜上皮厚度变薄。

结论:肠道真菌菌群失调延迟角膜创伤的修复,降低角膜创伤后的炎症反应。

关键词:肠道真菌菌群失调;角膜;创伤修复;炎症反应

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.5.04

Effect of intestinal fungal dysbiosis on corneal wound healing in mice

Lu-Lu Jia¹, Ding-Li Lu¹, Su-Su Liu¹, Yu-Qing Chen¹, Zhi-Jie Li^{1,2}, Li-Ya Wang¹

Foundation items: National Natural Science Foundation Henan Joint Fund Key Support Project (No. U1704283); National Natural Science Foundation of China (No. 81670827); Zhengzhou City Project for Science and Technology Talents Team Construction Plan Science and Technology Innovation Team (No. 131PCXTD620); Henan Science and Technology Development Project (No. 20150213)

¹People's Hospital of Zhengzhou University, Henan Eye Hospital, Henan Eye Institute, Henan Provincial People's Hospital, Henan Key Laboratory of Ophthalmology and Vision Science, Zhengzhou 450003, Henan Province, China; ²Institute of Ophthalmology, Jinan University Medical School, Key Laboratory for Regenerative Medicine, Ministry of Education, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Correspondence to: Li-Ya Wang. People's Hospital of Zhengzhou University, Henan Eye Hospital, Henan Eye Institute, Henan Provincial People's Hospital, Henan Key Laboratory of Ophthalmology and Vision Science, Zhengzhou 450003, Henan Province, China. wangliya_55@126.com

Received: 2018-11-06 Accepted: 2019-04-03

Abstract

• AIM: To investigate the effect of intestinal fungal dysbiosis induced by antifungal drug on corneal wound healing in mice.

• METHODS: Male C57BL/6J mice (free of eye disease) were divided into two groups randomly: control (Ctrl) group and amphotericin B treated (Amph) group. The Ctrl group was given a normal diet, and the Amph group was supplemented with amphotericin B to induce intestinal fungal dysbiosis. After 4wk intervention, corneal epithelial trauma was implemented in both groups. Corneal fluorescein staining was used to evaluate the corneal wound area dynamically. Immunofluorescence staining was applied to observe the changes of corneal epithelial cells and inflammatory cells. HE staining was used to assess the change of corneal thickness.

• RESULTS: Compared with Ctrl group, Amph group had delayed re-epithelialization rate and wound repair, less inflammatory cells and thinner corneal.

• CONCLUSION: Intestinal fungal dysbiosis delays the corneal wound healing, leading to a weak inflammatory response.

• KEYWORDS: intestinal fungal dysbiosis; corneal; wound healing; inflammatory response

Citation: Jia LL, Lu DL, Liu SS, et al. Effect of intestinal fungal dysbiosis on corneal wound healing in mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(5):724-728

0 引言

角膜创伤是眼科常见的急症,角膜创伤的愈合是一个重要的临床问题,快速良好的角膜创伤修复对于恢复角膜完整性和视力至关重要。角膜的创伤修复是一个动态、有序的过程,涉及到复杂的细胞和分子机制。这一过程中生长因子和细胞因子是重要的调节因子,可刺激参与伤口愈合的细胞生长、增殖、迁移、分化、黏附,以及细胞外基质沉

积和蛋白酶调节等^[1-2]。动物实验研究显示,在角膜创伤修复的初期,角膜上的免疫细胞通过角膜缘血管网向创伤区域迁移,通过释放大量的生长因子、细胞因子和各种酶类等物质促进创伤的愈合。其中中性粒细胞和 $\gamma\delta T$ 细胞发挥着重要的作用^[3-5]。因此,任何破坏或者干扰炎症细胞功能和免疫反应过程的因素都会造成角膜创伤修复的延迟。

哺乳动物肠道存在着多样复杂的共生微生物,其中包括细菌、古生菌、真菌、病毒等。人体肠道中约定植 $10^{12} \sim 10^{14}$ 个微生物,基因总量是人基因的 150 倍,被称为人类的第二套基因组^[6]。大量研究表明,肠道微生物参与人体的营养代谢、肠道功能、免疫调节等生理过程,肠道微生态的失调伴随多系统疾病的发生,如心脑血管疾病、肥胖、糖尿病,甚至神经组织的修复再生等^[7-10]。这些研究主要阐明肠道细菌与疾病发生和发展的关系,但在肠道真菌方面研究甚少。肠道真菌作为肠道微生态的重要一员,亦有着不可忽视的作用。长期口服抗真菌药物两性霉素 B 可造成肠道真菌菌群失调,增加炎症性肠道疾病和过敏性呼吸道疾病的严重程度。并且两性霉素 B 在肠道几乎不可吸收,因此可以排除肠道外非特异效应的作用^[11-12]。本研究通过两性霉素 B 诱导肠道真菌菌群失调,从而探索肠道真菌菌群失调对角膜创伤修复的影响,试图从肠道真菌菌群方面为角膜创伤的治疗提供思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 60 只,8~12 周龄,体质量 23~25g,均购自南京大学-南京生物医药研究院,裂隙灯下检查双眼角膜均无病变。小鼠的饲养与使用均遵照视觉与眼科研究协会制定的科研动物使用规范,经河南省眼科学与视觉科学重点实验室管理与伦理审查委员会批准。动物饲养环境为 12h 光照/12h 黑暗(上午 6:00 开灯,下午 6:00 关灯)的循环周期。

1.1.2 主要实验试剂 免疫荧光试剂 FITC/Gr-1 (553127, BD Bioscience); PE/GL3 (553178, BD Bioscience); 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (944021, 美国 Invitrogen 公司); Bovine Serum Albumin (9048-46-8, BIOSHARP); Triton X-100 (T8200, 北京索莱宝科技有限公司); 封片胶 (F4680-25ML, 美国 Sigma 公司); 多聚甲醛 (北京索莱宝科技有限公司); 戊巴比妥钠 (国药集团化学试剂有限公司); 荧光素钠 (H11619-1009, 美国 Alcon 公司); 两性霉素 B (大连美仑生物技术有限公司); 粪便样本 DNA 提取试剂盒 (Omega)。

1.1.3 主要仪器设备 手术显微镜 (YZ20T4, 苏州六六视觉科技股份有限公司); 超净工作台 (SW-CJ-1F, 苏净集团苏州安泰空气技术公司); 裂隙灯 (SL 8Z, 日本 Topcon); 解剖显微镜 (Discovery V20, 德国 Zeiss); 荧光显微镜 (Eclipse 80i, 日本 Nikon); 单光子共聚焦荧光显微镜 (Nikon C1Si, 日本); 移液器 (法国 Gilson); 角膜剪和显微无齿镊 (苏州明仁医疗器械厂); 环钻 (2mm, 美国); 高尔夫刀 (Accutome, 美国); 分析天平 (PL402-L, 瑞士)。

1.2 方法

1.2.1 诱导小鼠肠道真菌菌群失调 利用抗真菌药物两性霉素 B 诱导小鼠肠道真菌菌群失调,选取体质量均一 (23 ± 2 g)、角膜无病变小鼠 60 只,随机分为两组:两性

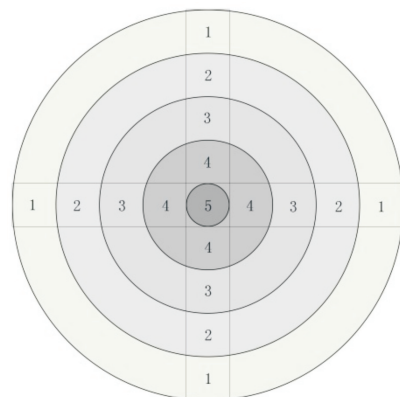


图1 角膜分区模式示意图(1区为角膜缘区,5区为角膜中央区)。

霉素 B 组 (Amph) 与对照组 (Ctrl)。两性霉素 B 组按 $60\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 的剂量将两性霉素 B 加入小鼠饮食中喂养 4wk^[13],对照组正常饮食喂养 4wk。

1.2.2 小鼠粪便样本收集和 DNA 提取 饲养 4wk 后将待取样小鼠放入铺有灭菌滤纸的笼子内,每笼 1 只小鼠,排便后立即用无菌棉签收集小鼠粪便,不同的小鼠取样要更换新的滤纸。采集的小鼠粪便参照粪便样本 DNA 提取试剂盒使用方法 (E. Z. N. A.™ Stool DNA Kit) 提取样本 DNA。采用包含“GTGAATCATCGARTC”序列的上游引物和包含“TCCTCCGCTTATTGAT”序列的下游引物扩增真菌 ITS rDNA 上的 ITS2 高变区,构建高通量测序文库并检测,然后利用 Illumina MiSeq PE250 平台进行测序。测序结果经过分析,得到样本物种信息。

1.2.3 小鼠角膜上皮创伤 两性霉素 B 诱导肠道真菌菌群失调后,于中午 12:00 制作小鼠角膜上皮创伤模型。10g/L 戊巴比妥钠按 $80\text{mg}/\text{kg}$ 剂量腹腔注射麻醉小鼠。解剖显微镜下使用环钻在小鼠角膜中央标记直径为 2mm 圆形区域,采用高尔夫刀机械性刮除标记圆形区域的角膜上皮细胞层^[5]。以上过程均在超净工作台中进行。

1.2.4 角膜上皮创伤修复观察 创伤后 0、6、12、18、24、30h 采用 20g/L 荧光素钠溶液染色两组小鼠角膜,在裂隙灯显微镜下观察角膜创伤修复情况并拍照,通过图像处理软件 Photoshop CS6 (13.0.1) 计算创伤区域面积。

1.2.5 角膜免疫荧光标记 两组小鼠分别于创伤后 0、6、12、18、24、30、36h 各时间点分别处死 3 只小鼠,取角膜组织,修剪角膜去除虹膜、晶状体等组织,于 2% 多聚甲醛中固定 40min,固定后 $1 \times \text{PBS}$ 冲洗角膜,添加 0.2% Triton-BSA 溶液中室温破膜、封闭 30min,然后分别加入 FITC/Gr-1、PE/GL3, 4°C 避光孵育过夜,次日加入 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 染液,避光室温染色。染色后取出角膜组织, $1 \times \text{PBS}$ 冲洗。将角膜上皮层朝上使用手术刀片将角膜均匀切割成 4 瓣平铺于载玻片上,使用封片胶封片。

1.2.6 分裂细胞、中性粒细胞和 $\gamma\delta T$ 细胞定量分析 小鼠角膜进行免疫荧光染色后,对角膜中分裂细胞、中性粒细胞和 $\gamma\delta T$ 细胞进行定量分析。将角膜从角膜缘到角膜中央依次分为 1~5 区(图 1)。在单光子共聚焦显微镜 40 倍油镜下分别计数角膜两条直径上从一侧角膜缘到另一侧角膜缘 9 个视野 DAPI 标记的分裂细胞、PE/GL3 标记

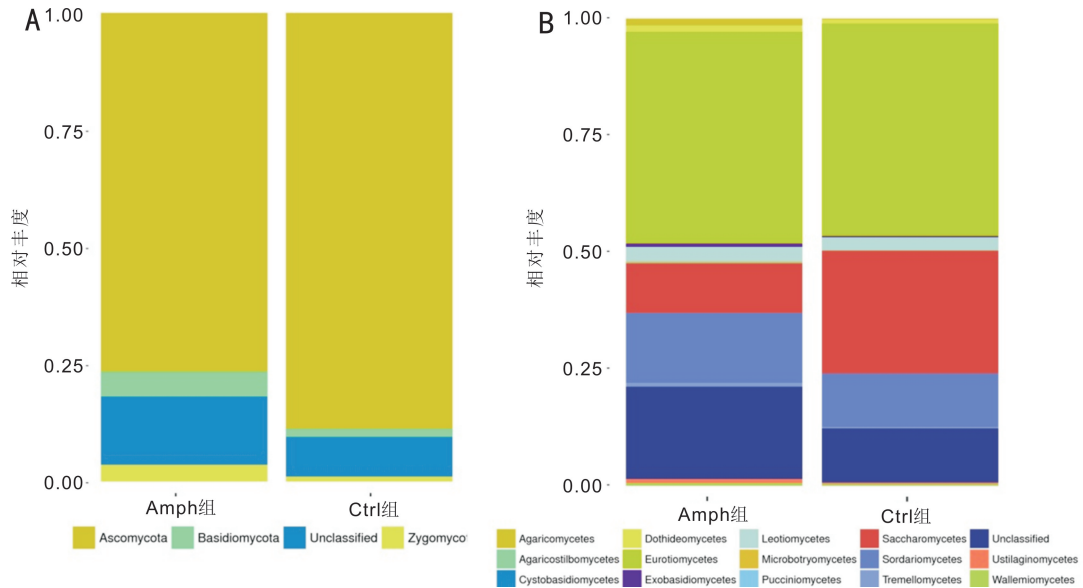


图2 两组小鼠肠道真菌菌群在门、纲水平上的构成 A:门水平;B:纲水平(不同颜色表示不同菌群)。

表1 Alpha多样性分析

| 组别 | Ace | Chao1 | Shannon | Simpson | goods_coverage |
|-------|-------------|--------------|-----------|-----------|----------------|
| Ctrl组 | 94.87±8.36 | 100.71±14.67 | 5.17±0.39 | 0.92±0.01 | 1.00±0.00 |
| Amph组 | 99.30±12.58 | 100.50±12.75 | 4.12±0.84 | 0.93±0.02 | 1.00±0.00 |
| Z | -0.52 | -0.31 | -2.41 | -0.73 | 0.00 |
| P | 0.60 | 0.75 | 0.02 | 0.47 | 1.00 |

注:Ctrl组:对照组;Amph组:两性霉素B组。

表2 两组小鼠创伤后不同时间点分裂细胞计数

| 组别 | 0h | 6h | 12h | 18h | 24h | 30h | 36h |
|-------|------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Ctrl组 | 12.67±4.19 | 24.17±8.68 | 53.25±10.29 | 112.58±25.14 | 219.58±58.02 | 209.92±29.42 | 256.42±25.25 |
| Amph组 | 7.08±2.75 | 11.17±5.04 | 42.58±10.26 | 58.75±10.45 | 141.25±28.40 | 109.58±25.93 | 133.92±46.83 |
| t | 3.86 | 4.48 | 2.54 | 6.85 | 4.20 | 8.86 | 7.98 |
| P | 0.001 | <0.01 | 0.019 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

注:Ctrl组:对照组;Amph组:两性霉素B组。

的 $\gamma\delta T$ 细胞。单光子共聚焦显微镜断层扫描角膜两条直径上第4区 FITC/Gr-1 标记的嗜中性粒细胞,然后使用 Imaris7.2.1 软件进行定量统计。

1.2.7 角膜上皮厚度测量 两组分别于创伤后 24、48、96h 各处死 3 只小鼠,取下完整小鼠眼球,经固定、脱水浸蜡、包埋、切片、脱蜡等过程,制作石蜡切片并进行 HE 染色,在显微镜 10 倍物镜下拍摄图像并使用 Image J 软件进行角膜厚度定量计算。

统计学分析:使用 SPSS21.0 统计软件分析数据。各组数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,分裂细胞、中性粒细胞、 $\gamma\delta T$ 细胞和角膜厚度各时间点组间差异比较采用独立样本 t 检验。菌群多样性和结构分析采用秩和检验 Mann-Whitney U 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两性霉素 B 诱导后小鼠肠道真菌菌群发生改变 小鼠粪便样本 ITS rDNA 测序结果显示:两性霉素 B 处理 4wk 后,小鼠肠道真菌菌群多样性和结构发生改变,其中 Alpha 多样性分析显示两组 Shannon 指数差异有统计学意义($P=0.02$),其余各项指标差异无统计学意义(表 1)。

说明抗真菌药物处理后肠道真菌菌群的多样性存在一定程度的差异。肠道真菌菌群结构分析显示,在门水平上,两组间担子菌门(basidiomycota)和接合菌门(zygomycota)差异有统计学意义($P=0.032, 0.008$,图 2A);在纲水平上,两组酵母菌纲(saccharomycetes)、黑粉菌纲(ustilaginomycetes)及微球黑粉菌纲(microbotryomycetes)差异有统计学意义($P=0.008, 0.016, 0.032$,图 2B)。结果证明,两性霉素 B 处理后造成小鼠肠道真菌菌群改变。

2.2 肠道真菌菌群失调对小鼠角膜创伤再上皮化的影响

角膜上皮创伤后,两组小鼠角膜均逐渐进行修复,Ctrl 组小鼠创伤后 24h 荧光素钠染色角膜上皮无着染,而 Amph 组仍有部分着染,并且创伤后 30h 仍有着染(图 3A)。Amph 组小鼠与 Ctrl 组小鼠相比,角膜创伤后再上皮化速度明显延缓(图 3B)。创伤后,两组分裂细胞数量持续增加,但 Amph 组上皮层分裂细胞总数显著低于 Ctrl 组,各时间点比较差异均有统计学意义(表 2)。实验表明肠道真菌菌群失调导致小鼠角膜创伤后再上皮化时间延长,上皮层分裂细胞数量与 Ctrl 组相比显著下降。

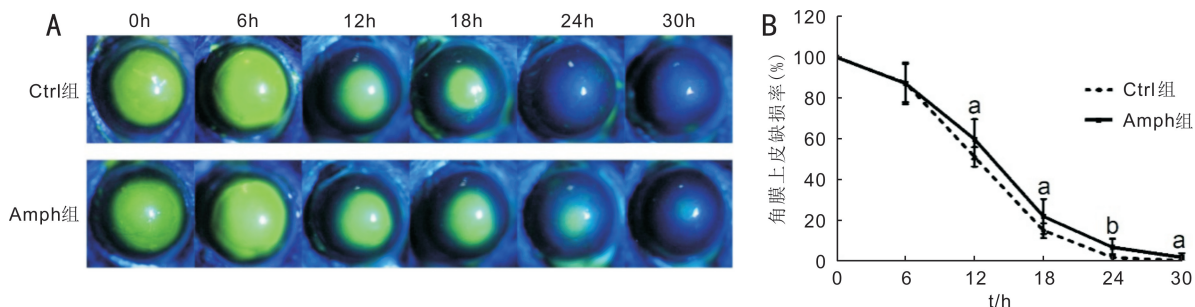


图3 两组小鼠角膜创伤修复的动态变化 A:创伤后不同时间点荧光素钠染色显示创伤面积;B:创伤后各时间点两组的角膜创伤面积占创伤原始面积百分比(^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs Ctrl组)。

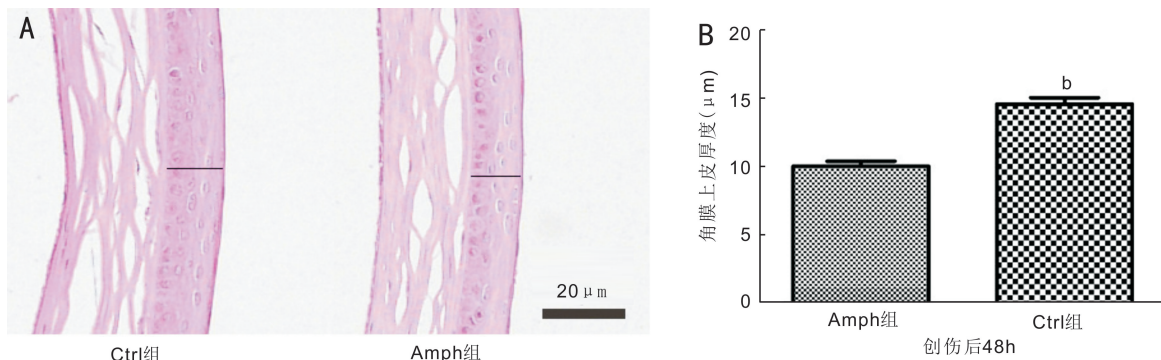


图4 两组小鼠创伤后48h角膜HE染色和上皮层厚度定量 A:创伤后48h角膜上皮组织形态变化($\times 100$);B:创伤后48h角膜上皮厚度定量计算(^b $P < 0.001$ vs Ctrl组)。

表3 两组小鼠创伤后不同时间点 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞计数

($\bar{x} \pm s$, 个/视野)

| 组别 | 0h | 6h | 12h | 18h | 24h | 30h | 36h |
|----------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Ctrl组 | 105.17 \pm 13.08 | 106.5 \pm 21.13 | 104.67 \pm 21.91 | 123.50 \pm 28.08 | 196.83 \pm 44.65 | 158 \pm 27.96 | 62.25 \pm 14.28 |
| Amph组 | 82.42 \pm 27.66 | 82.75 \pm 17.83 | 85.33 \pm 21.06 | 99.17 \pm 24.71 | 144.25 \pm 15.89 | 89.08 \pm 10.87 | 49.33 \pm 17.21 |
| <i>t</i> | 2.58 | 2.98 | 2.20 | 2.25 | 3.84 | 7.96 | 2.00 |
| <i>P</i> | 0.021 | 0.007 | 0.038 | 0.035 | 0.002 | <0.01 | 0.058 |

注:Ctrl组:对照组;Amph组:两性霉素B组。

表4 两组小鼠创伤后不同时间点中性粒细胞计数

($\bar{x} \pm s$, 个/视野)

| 组别 | 6h | 12h | 18h | 24h | 30h | 36h |
|----------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Ctrl组 | 87.33 \pm 28.25 | 204.33 \pm 38.87 | 273.83 \pm 18.74 | 348.17 \pm 85.95 | 273.50 \pm 52.59 | 234.67 \pm 39.03 |
| Amph组 | 56.50 \pm 29.28 | 188.67 \pm 43.04 | 223.17 \pm 44.35 | 236.17 \pm 30.32 | 165.33 \pm 59.45 | 137.50 \pm 48.44 |
| <i>t</i> | 1.86 | 0.66 | 2.58 | 3.01 | 3.34 | 3.83 |
| <i>P</i> | 0.093 | 0.523 | 0.038 | 0.023 | 0.008 | 0.003 |

注:Ctrl组:对照组;Amph组:两性霉素B组。

2.3 肠道真菌菌群失调对小鼠角膜炎症细胞的影响 通过观察创伤后炎症细胞的数量变化,说明肠道真菌菌群失调对炎症反应的影响。两组 $\gamma\delta\text{T}$ 和中性粒细胞数量在创伤后均明显增加,但是与Ctrl组相比,Amph组角膜两条径线上 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞数量显著下降(表3),中性粒细胞数量也明显降低(表4)。结果表明,肠道真菌菌群失调小鼠创伤后炎症反应降低,炎症细胞数量明显减少。

2.4 肠道真菌菌群失调对创伤修复后角膜厚度的影响

Amph组小鼠角膜创伤后上皮厚度在创伤后24、48、96h均小于Ctrl组($t_{24\text{h}} = 2.60, P_{24\text{h}} = 0.014; t_{48\text{h}} = 7.58, P_{48\text{h}} < 0.01; t_{96\text{h}} = 2.85, P_{96\text{h}} = 0.007$),创伤后48h时Amph组角膜上皮厚度为 $10.02 \pm 1.62 \mu\text{m}$,Ctrl组小鼠角膜上皮厚度为 $14.58 \pm 1.97 \mu\text{m}$,差异有统计学意义($P < 0.001$,图4)。表明肠道真菌菌群失调小鼠角膜创伤后再上皮化及复层化能力显著降低,角膜上皮厚度下降。

3 讨论

创伤后炎症反应是组织完成修复的一个必经过程^[14]。组织创伤后通过一系列的微血管反应,大量的炎症因子和其他因子等刺激微血管扩张、血管内皮细胞间隙增大、黏附分子表达增加,促使炎症细胞向创伤区域迁移、浸润^[15]。角膜创伤后, $\gamma\delta\text{T}$ 细胞在趋化因子CCL20的诱导下聚集在角膜上皮层, $\gamma\delta\text{T}$ 细胞可以产生IL-17、IL-20和IL-22等炎症因子,促使中性粒细胞向创伤区域的募集和上皮细胞的分裂,从而诱导炎症反应和促进上皮修复,TCR $\delta^{-/-}$ 小鼠角膜创伤后表现出炎症反应的降低、创伤愈合的延迟,在创伤后96h上皮细胞密度的降低,所以 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞在角膜创伤后中性粒细胞在角膜缘血管中的定位和上皮细胞的有丝分裂至关重要^[4-5,16]。创伤早期,白细胞的迁移可以促进再上皮化,研究表明通过抗体中和法去除中性粒细胞的小鼠角膜创伤愈合延迟,证明中性粒细胞参

与创伤修复^[17]。本研究中,角膜上皮创伤后,角膜缘 $\gamma\delta T$ 细胞和中性粒细胞均迅速增多,中性粒细胞在创伤后迅速向创伤区域迁移,但创伤后 6、12h 中性粒细胞在第 4 区计数差异无统计学意义,可能是炎症反应初期中性粒细胞仍未大量迁移至创伤区域,但创伤后 24h 在角膜第 4 区浸润量达高峰,之后又逐渐恢复正常。但肠道真菌菌群失调组 $\gamma\delta T$ 细胞在角膜缘聚集明显减少,分裂细胞数量和中性粒细胞的浸润减少,导致角膜创伤的愈合延迟,在创伤后 24、48、96h 角膜上皮厚度均较对照组明显减少,这也验证了上述研究的结果。所以正常的免疫反应在角膜创伤修复中占有重要地位。

正常的肠道菌群对免疫系统具有重要作用。过去的研究表明,肠道细菌对调节机体稳态和免疫反应至关重要;然而,近几年来研究发现肠道真菌对这些过程也有很大的影响^[18-19]。新的研究表明,真菌菌群的破坏可能会对宿主免疫系统产生有害影响^[20-22]。在对慢性酒精性肝硬化、强直性脊柱炎等疾病的研究中,均发现肠道真菌菌群多样性和结构上的改变,这些疾病的发生和肠道真菌菌群之间关系密切^[13,23]。研究表明在宿主抗真菌的免疫反应中 NF- κ B 信号通路发挥重要作用^[24],并且 IL-22、IL-17 参与肠道黏膜免疫反应,直接参与控制肠道真菌菌群,缺乏 IL-22 的小鼠胃肠道更易感染念珠菌^[18,25]。而 NF- κ B 信号通路被认为是与角膜创伤后炎症反应关系最密切的调控分子,IL-17 和 IL-22 在角膜创伤修复中也有重要的作用^[26]。因此我们推测,肠道真菌失调可能通过多种机制影响局部和全身免疫状态,其中包括调节细胞因子环境、激活不同细胞类型和释放代谢物等^[22],从而影响了创伤修复中炎症反应的信号传导通路、炎症细胞的迁移和募集、炎症因子和其他调节因子的产生,进一步降低了炎症反应并延缓修复过程。

本实验采用属于近交系的 C57 小鼠,因其具有基因纯合度高、遗传背景明确、动物模型重复性较好的优点,所以我们前期很多研究都建立在 C57 小鼠上,其它品系小鼠是否会有不同的研究发现,可以作为我们下一步新的研究方向。另外本研究发现抗真菌药物处理后肠道真菌中一些菌群发生明显变化,但在国内外文献中未见对这些显著差异菌属的研究报道,因此其与机体免疫反应和肠道微生态的相关性不甚明确,对角膜创伤修复的影响更是知之甚少。并且肠道真菌和细菌之间有着密切的拮抗、互利、共生关系,可以通过物理接触和分泌分子直接发生,或者通过改变宿主的免疫反应间接发生^[22,27]。那么小鼠角膜创伤修复的延迟是由肠道真菌菌群失调直接导致还是间接的细菌改变所造成,仍需要后续大量的实验来验证。本研究虽然发现肠道真菌菌群的失调延缓了角膜创伤的修复,但是未能揭示肠道真菌菌群的具体作用机制以及与角膜创伤修复的相互关系,这将是我们的下一步研究的方向和重点。

参考文献

- 1 Ljubimov AV, Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing. *Prog Retin Eye Res* 2015;49:17-45
- 2 Liu CY, Kao WW. Corneal Epithelial Wound Healing. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015;134(1):61-71
- 3 Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011;11(8):519-531

- 4 Li Z, Burns AR, Rumbaut RE, et al. Gamma delta T cells are necessary for platelet and neutrophil accumulation in limbal vessels and efficient epithelial repair after corneal abrasion. *Am J Pathol* 2007;171(3):838-845
- 5 Li Z, Burns AR, Miller SB, et al. CCL20, gammadelta T cells, and IL-22 in corneal epithelial healing. *FASEB J* 2011;25(8):2659-2668
- 6 Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464(7285):59-65
- 7 车媛,刘凯. 真菌菌群在肠道疾病中的作用进展. 肠外与肠内营养 2015;22(6):378-381
- 8 Rohde CL, Bartolini V, Jones N. The use of probiotics in the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea with special interest in clostridium difficile-associated diarrhea. *Nutr Clin Pract* 2009;24(1):33-40
- 9 郭慧玲,邵玉宇,孟和毕力格,等. 肠道菌群与疾病关系的研究进展. 微生物学通报 2015;42(2):400-410
- 10 Kigerl KA, Hall JC, Wang L, et al. Gut dysbiosis impairs recovery after spinal cord injury. *J Exp Med* 2016;213(12):2603
- 11 Wheeler ML, Limon JJ, Bar AS, et al. Immunological consequences of intestinal fungal dysbiosis. *Cell Host Microbe* 2016;19(6):865-873
- 12 Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis* 1990;12(2):308-329
- 13 Yang AM, Inamine T, Hochrath K, et al. Intestinal fungi contribute to development of alcoholic liver disease. *J Clin Invest* 2017;127(7):2829-2841
- 14 Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008;453(7193):314-321
- 15 Pober JS, Sessa WC. Evolving Functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007;7(10):803-815
- 16 Zhang W, Magadi S, Li Z, et al. IL-20 promotes epithelial healing of the injured mouse cornea. *Exp Eye Res* 2017;154:22-29
- 17 Li Z, Burns AR, Smith CW. Two waves of neutrophil emigration in response to corneal epithelial abrasion: distinct adhesion molecule requirements. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(5):1947-1955
- 18 Underhill DM, Iliev ID. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Rev Immunol* 2014;14(6):405-416
- 19 Virgin HW. The virome in mammalian physiology and disease. *Cell* 2014;157(1):142-150
- 20 Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 2013;155(7):1451-1463
- 21 Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol* 2014;14:827-835
- 22 Iliev ID, Leonardi I. Fungal dysbiosis: immunity and interactions at mucosal barriers. *Nat Rev Immunol* 2017;17(10):635-646
- 23 张利龙,许尧,胡雨奇,等. 基于 ITS2 高通量测序研究强直性脊柱炎患者肠道真菌特征. 中国微生态学杂志 2018;30(2):125-131
- 24 Plato A, Hardison SE, Brown GD. Pattern recognition receptors in antifungal immunity. *Semin Immunopathol* 2015;37(2):97-106
- 25 De Luca A, Zelante T, D'Angelo C, et al. IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol* 2010;3(4):361-373
- 26 李岚,谢立信. 角膜损伤修复的分子调控机制研究进展. 国外医学眼科学分册 2005;29(4):235-238
- 27 Frey KP, Burlinson P, Deveau A, et al. Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011;75(4):583-609