

引文格式:李豪亮,朱然,张希熹,陆志峰,钱晶晶,梁舒. 茄病镰刀菌对人角膜上皮细胞 NOD2 表达及相关炎症因子分泌水平的影响[J]. 眼科新进展, 2021, 41(7): 633-637. doi:10.13389/j.cnki.rao.2021.0130

【实验研究】

# 茄病镰刀菌对人角膜上皮细胞 NOD2 表达及相关炎症因子分泌水平的影响<sup>△</sup>

李豪亮 朱然 张希熹 陆志峰 钱晶晶 梁舒

**作者简介:**李豪亮 (ORCID: 0000-0001-7271-7906), 男, 1995 年 11 月出生, 江苏南京人, 在读硕士研究生。主要研究方向: 视功能、角膜病及眼表疾病。E-mail: lhleye@163.com  
**通信作者:**梁舒 (ORCID: 0000-0003-0028-8086), 女, 江苏南通人, 博士, 副教授, 主任医师, 硕士研究生导师。主要研究方向: 视功能、角膜病及眼表疾病。E-mail: maggie7766@163.com

**收稿日期:**2021-03-05

**修回日期:**2021-04-22

**本文编辑:**方红玲

**△基金项目:**江苏省卫健委医学科面上项目(编号:H2019083);南通市科技计划项目(编号:MSZ19061)

**作者单位:**226001 江苏省南通市, 南通大学附属医院眼科

**【摘要】**目的 探讨茄病镰刀菌对人角膜上皮细胞(hCEC)中 NOD2 表达及下游炎症因子分泌水平的影响。**方法** 将对数生长期的 hCEC 分为对照组(无真菌刺激)、真菌刺激组(根据加入真菌浓度不同分为  $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  CFU · mL<sup>-1</sup> 刺激组), 真菌刺激组分别刺激 hCEC 4 h、8 h、12 h、16 h, RT-qPCR 检测各组 hCEC 中 NOD2 mRNA 表达;  $10^5$  CFU · mL<sup>-1</sup> 茄病镰刀菌孢子刺激 12 h、24 h、36 h, Western blot 检测各组 hCEC 中 NOD2 蛋白表达; 细胞免疫荧光法检测 NOD2 分子定位和表达;  $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  CFU · mL<sup>-1</sup> 茄病镰刀菌孢子刺激 hCEC 36 h, ELISA 法检测各组 hCEC 培养上清液中炎症因子白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 蛋白含量。**结果** 随着茄病镰刀菌孢子刺激浓度的升高和刺激时间的延长, hCEC 中 NOD2 mRNA 表达逐渐升高,  $10^5$  CFU · mL<sup>-1</sup> 茄病镰刀菌孢子刺激 8 h, hCEC 中 NOD2 mRNA 相对表达水平达到峰值, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ );  $10^5$  CFU · mL<sup>-1</sup> 茄病镰刀菌孢子刺激 hCEC 12 h、24 h、36 h, hCEC 中 NOD2 蛋白相对表达水平逐渐增多, 与对照组相比差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ );  $10^5$  CFU · mL<sup>-1</sup> 茄病镰刀菌孢子刺激 24 h 后, NOD2 主要表达在 hCEC 细胞质中, 其荧光分子表达强度显著增加。随着茄病镰刀菌孢子刺激浓度的增加, hCEC 中相关炎症因子的分泌水平增加,  $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  CFU · mL<sup>-1</sup> 茄病镰刀菌孢子刺激 hCEC 36 h, IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  蛋白含量与对照组相比, 差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。**结论** 茄病镰刀菌孢子刺激可上调 hCEC 中 NOD2 表达并促进相关炎症因子分泌, NOD2 参与了 hCEC 抗茄病镰刀菌的固有免疫反应。

**【关键词】** 茄病镰刀菌; 炎症因子; 人角膜上皮细胞; NOD2

**【中图分类号】** R772.2

真菌性角膜炎(FK)是由真菌入侵角膜产生免疫应答而引起的致盲性眼病<sup>[1]</sup>。FK 导致的后果严重, 是发展中国家劳动人群失明的主要原因之一, 在中国某些地区成为角膜盲的首要原因<sup>[2-3]</sup>。FK 的致病真菌在中国主要是镰刀菌属和曲霉菌属<sup>[4-5]</sup>。研究发现, 角膜上皮细胞表达多种模式识别受体(PRRs), 可介导并识别镰刀菌等真菌菌丝与孢子抗原诱导角膜上皮产生固有免疫反应, 进而清除病原菌, 在角膜上皮细胞抗真菌免疫调节中发挥首要作用。角膜上皮细胞表达的 PRRs 有 Toll 样受体、C 型凝集素受体、甘露糖受体等, 新近研究发现 NOD 样受体(NLRs)也表达于人角膜上皮细胞(hCEC)<sup>[6-7]</sup>。NLRs 属于胞浆内 PRRs, 可识别胞内菌及其衍生物, 具有细胞内免疫监视作用。当 NLRs 结合抗原后, 丝氨酸/苏氨酸激酶 2 被激活并启动 NF- $\kappa$ B、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、Caspase-1 等信号通路, 介导炎症因子产生并诱导细胞凋亡<sup>[8-10]</sup>。

目前, 国内外对曲霉菌性角膜炎的分子免疫机制研究较多, 对镰刀菌性角膜炎的分子免疫机制研究较少, 而 NOD2 在真菌感染中的作用相关研究罕见, 尚未见有研究茄病镰刀菌对 hCEC 中 NOD2 表达的影响。因此, 本研究采用灭活的茄病镰刀菌孢

子刺激 hCEC, 观察不同浓度的茄病镰刀菌孢子刺激后对 hCEC 中 NOD2 及其下游炎症因子含量的影响, 进而探索 hCEC 抗茄病镰刀菌的固有免疫机制, 并为今后 FK 的治疗提供一种新的药物干预分子靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂与仪器** hCEC(冻存于南通大学附属医院眼科实验室)、茄病镰刀菌(北京北纳创联生物技术有限公司, 菌种编号: BNCC121547), DMEM 培养基、胎牛血清、双抗  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  胰蛋白酶、D-Hank's 液、DMSO、PBS 均购自 Gibco 公司(美国); 沙氏培养板(安图生物工程, 中国), NOD2 兔抗人多克隆一抗(美国 Signalway Antibody 公司)、HRP 标记的鼠抗兔二抗、荧光二抗 Alexa Fluor 488(英国 Abcam 公司); RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒(赛默飞世尔科技公司); RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸化蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、ELISA 试剂盒(深圳市达科为科技有限公司); 紫外分光光度计(Thermo 公司); 荧光定量 PCR 仪、酶标仪(Gene Company

Limited); 荧光显微镜(Leica 德国公司)。

**1.2 细胞分组** 将 hCEC 用含体积分数 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基置于 37 °C、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。选取传 3 代之后的 hCEC 进行研究。将 hCEC 分为对照组(不加入真菌)与真菌刺激组(按照加入真菌孢子浓度不同再分为 10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup> CFU · mL<sup>-1</sup> 茄病镰刀菌刺激组);按分组将 PBS 冲下的茄病镰刀菌孢子加入真菌刺激组。

### 1.3 方法

**1.3.1 体外真菌感染 hCEC 模型制备** 将生长良好的 hCEC 接种至 6 孔板,每孔 10<sup>5</sup> 个细胞,培养 24 h 待细胞贴壁后,取出 6 孔板进入微生物实验室。PBS 冲刷生长于沙氏培养基的茄病镰刀菌(27 °C 培养 7 d),将冲下的真菌孢子稀释后计数并配制茄病镰刀菌孢子悬液。65 °C 1 h 灭活真菌孢子后用纱布过滤至 EP 管,使母液浓度为 10 × 10<sup>6</sup> CFU · mL<sup>-1</sup>。将真菌刺激组根据加入茄病镰刀菌浓度再分为 10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup> CFU · mL<sup>-1</sup> 刺激组,每组分别设置空白对照组(不加真菌组)。补足对照组及各真菌刺激组 PBS 体积,使各组所含 PBS 体积保持一致。

**1.3.2 qRT-PCR 检测各组 hCEC 中 NOD2 mRNA 表达** 于培养箱取出生长在培养瓶中无杂菌污染的 hCEC,2.5 g · L<sup>-1</sup> 胰蛋白酶消化后用培养液稀释并吹打成单细胞悬液,调整细胞浓度后均匀接种至 12 孔板,待细胞贴壁后吸取上清培养液,根据分组处理完毕,各孔分别于 4 h、8 h、12 h、16 h 提取细胞 RNA 后利用紫外分光光度仪检测细胞 RNA 浓度,逆转录仪逆转录成 cDNA,于 PCR 仪检测各组 hCEC 中 NOD2 mRNA 表达。引物由上海生工生物有限公司合成,序列如下:β-actin 上游引物为 CGT-GGA-CAT-CCG-CAA-AGA-CCT-G、下游引物为 TGG-GAG-CCA-GAG-CAG-TGA-TCT-C,大小为 22 bp; mNOD-2 上游引物为 CCG-CAA-GCA-CTT-CCA-CTC-CAT-C、下游引物为 AGC-CGC-TCC-TCC-TGC-ATC-TC,大小为 20 bp。反应过程为:95 °C 预变性 2 min,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 60 s,持续 40 个循环,最终延伸 72 °C 7 min。每组 3 个复孔,NOD2 mRNA 的相对表达量以 β-actin 的表达为内参,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算。

**1.3.3 Western blot 检测各组 hCEC 中 NOD2 蛋白表达** 于培养箱取出生长在培养瓶中无杂菌污染的各组 hCEC,2.5 g · L<sup>-1</sup> 胰蛋白酶消化后用培养液稀释并吹打成单细胞悬液,血球计数板计数细胞,调整细胞浓度后均匀接种至 6 孔板,待细胞贴壁后吸取上清培养液,处理各孔细胞 12 h、24 h、36 h 后用 RIPA 裂解液提取细胞蛋白后用 BCA 蛋白定量检测各组 hCEC 中 NOD2 蛋白表达,经过配胶、电泳、转膜、封闭、一抗与二抗孵育、洗膜后显影。以 GAPDH 为内参蛋白,ImageJ 软件计算 GAPDH 和 NOD2 蛋白的灰度值并量化。

**1.3.4 细胞免疫荧光检测各组 hCEC 中 NOD2 的表达** 于 24 孔细胞培养板中每孔放置无菌细胞爬片(直径 14 mm),调整制备的 hCEC 悬液浓度(无血清 DMEM 稀释),每孔接种 3000 个 hCEC,细胞培养箱中培养 6 h 待细胞贴壁后取出 24 孔板,各真菌刺激组加入茄病镰刀菌孢子悬液,使每孔真菌孢子浓度为 10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup>,培养 24 h 后经过清洗、固定、封闭、一抗与二抗孵育、染色、封片,于荧光显微镜下拍照。

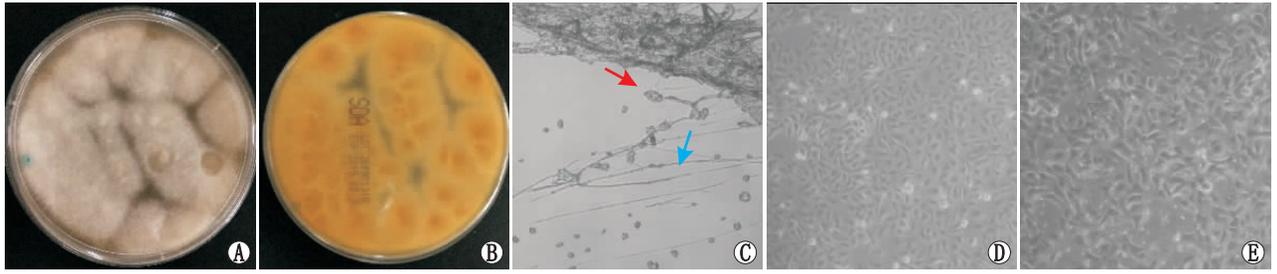
**1.3.5 ELISA 法检测各组 hCEC 上清液中 IL-6、IL-8、TNF-α 蛋白含量** 于培养箱取出生长在培养瓶中无杂菌污染的 hCEC,2.5 g · L<sup>-1</sup> 胰蛋白酶消化后用培养液稀释并吹打成单细胞悬液,调整细胞浓度后均匀接种至 6 孔板,待细胞贴壁后吸取上清培养液,根据分组处理各孔 36 h 后收取上清液,1000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后取上清,分别用 IL-6、IL-8、TNF-α ELISA 试剂盒检测各组 hCEC 上清液中不同炎症因子的蛋白含量。

**1.4 统计学方法** 采用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据处理,所有数据采用均数 ± 标准差表示。整体间差异采用单因素方差分析,各组间差异采用独立样本 *t* 检验。检验水准:α = 0.05。

## 2 结果

**2.1 细胞和菌种形态特征及模型建立** 茄病镰刀菌接种于沙氏培养基,于 27 °C 培养 7 d 后正面呈白色绒毛状,背面呈浅黄色(图 1A、B)。真菌涂片检光镜下可见大量真菌分隔菌丝及孢子(图 1C)。传代细胞接种于 6 孔板约 3 h 可贴壁,呈圆形;6 h 开始细胞体积逐渐增大,逐渐变为长梭形,12 h 开始进入对数生长期,48 h 可见细胞生长形态趋于稳定,为多角短梭形、排列紧密的上皮样形态(图 1D)。收集的真菌孢子灭活处理后调整浓度加入含 hCEC 的 6 孔板,建立真菌孢子刺激 hCEC 模型(图 1E)。

**2.2 各组 hCEC 中 NOD2 mRNA 表达** 10<sup>3</sup> CFU · mL<sup>-1</sup> 茄病镰刀菌孢子刺激 hCEC 4 h、8 h、12 h、16 h 后,hCEC 中 NOD2 mRNA 相对表达水平分别为 1.14 ± 0.20、1.21 ± 0.16、1.18 ± 0.18、1.17 ± 0.07,对照组为 1.04 ± 0.37,组间比较,差异无统计学意义(*F* = 0.263, *P* > 0.05)。10<sup>4</sup> CFU · mL<sup>-1</sup> 茄病镰刀菌孢子刺激 hCEC 4 h、8 h、12 h、16 h 后,hCEC 中 NOD2 mRNA 相对表达水平分别为 1.31 ± 0.12、1.89 ± 0.04、1.61 ± 0.16、1.62 ± 0.13,与对照组(1.03 ± 0.29)比较,刺激 4 h 差异无统计学意义(*t* = -1.572, *P* > 0.05),刺激 8 h、12 h、16 h 差异均有统计学意义(*t* = -5.045、-3.016、-3.178,均为 *P* < 0.05)。10<sup>5</sup> CFU · mL<sup>-1</sup> 茄病镰刀菌孢子刺激 hCEC 4 h、8 h、12 h、16 h 后,hCEC 中 NOD2 mRNA 相对表达水平分别为 1.34 ± 0.16、2.98 ± 0.14、1.77 ± 0.18、1.38 ± 0.09,与对照组(1.01 ± 0.18)比较,刺激 4 h 差异无统计学意义(*t* = -2.335, *P* > 0.05),



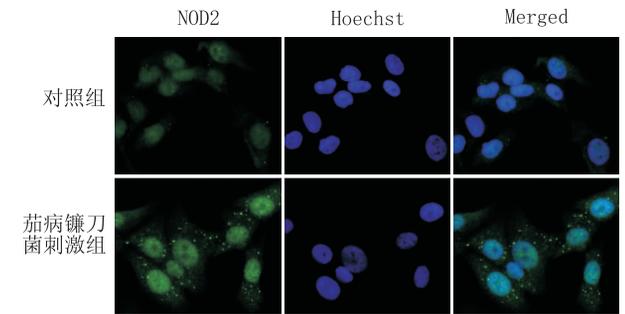
**图1 茄病镰刀菌和hCEC形态及茄病镰刀菌孢子感染hCEC模型** A:茄病镰刀菌菌落正面; B:茄病镰刀菌菌落背面; C:菌丝涂片,菌丝(蓝色箭头),假头状小分生孢子(红色箭头)( $\times 200$ ); D:hCEC培养48 h,细胞较多,呈多角形、单层生长,融合度达80%左右; E:茄病镰刀菌孢子感染hCEC,镜下可见hCEC周围存在大量镰刀状分生孢子。

刺激 8 h、12 h、16 h 差异均有统计学意义 ( $t = -14.894, -5.158, -3.171$ , 均为  $P < 0.05$ )。  $10^6$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$  茄病镰刀菌孢子刺激 hCEC 4 h、8 h、12 h、16 h 后, hCEC 中 NOD2 mRNA 相对表达水平分别为  $1.79 \pm 0.35, 2.70 \pm 0.35, 2.42 \pm 0.42, 1.58 \pm 0.15$ , 与对照组 ( $1.04 \pm 0.35$ ) 比较, 刺激 4 h、16 h 差异均无统计学意义 ( $t = -2.625, -2.466$ , 均为  $P > 0.05$ ), 刺激 8 h、12 h 差异均有统计学意义 ( $t = -5.794, -4.381$ , 均为  $P < 0.05$ )。

**2.3 各组 hCEC 中 NOD2 蛋白表达**  $10^5$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$  茄病镰刀菌孢子刺激 hCEC 12 h、24 h、36 h, hCEC 中 NOD2 蛋白相对表达水平分别为  $1.62 \pm 0.13, 2.18 \pm 0.33, 1.78 \pm 0.12$ , 与对照组 ( $1.00 \pm 0.06$ ) 相比, 差异均有统计学意义 ( $t = -7.379, -6.026, -10.023$ , 均为  $P < 0.05$ ) (见图 2)。  $10^5$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$  茄病镰刀菌孢子刺激 hCEC 24 h 后, hCEC 中 NOD2 荧光分子表达量与对照组相比显著增强 (见图 3)。

**2.4 各组 hCEC 上清液中炎症因子 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  分泌**  $10^3, 10^4, 10^5, 10^6$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$  茄病镰刀菌孢子刺激 hCEC 36 h 后, IL-6 蛋白含量与对照组相比,  $10^3$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$  刺激组差异无统计学意义 ( $t = -1.091, P > 0.05$ ),  $10^4, 10^5, 10^6$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$  刺激组差异均有统计学意义 ( $t = -20.663, -33.675, -39.778$ , 均为  $P < 0.05$ ); IL-8 蛋白含量与对照组相比,  $10^3$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$  刺激组差异无统计学意义 ( $t = -0.01, P > 0.05$ ),  $10^4, 10^5, 10^6$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$  刺激组

差异均有统计学意义 ( $t = -18.957, -8.608, -10.671$ , 均为  $P < 0.05$ ); TNF- $\alpha$  蛋白含量与对照组相比,  $10^3$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$  刺激组差异无统计学意义 ( $t = -0.825, P > 0.05$ ),  $10^4, 10^5, 10^6$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$  刺激组差异均有统计学意义 ( $t = -8.437, -6.182, -7.079$ , 均为  $P < 0.05$ ) (见表 1)。



**图3  $10^5$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$  茄病镰刀菌孢子刺激24 h 后 hCEC 中 NOD2 荧光分子的定位和表达**

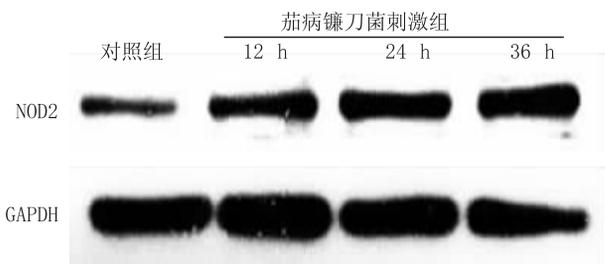
**表1 各组 hCEC 上清液中 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  蛋白含量比较**

组别	IL-6/ng $\cdot$ L $^{-1}$	IL-8/ng $\cdot$ L $^{-1}$	TNF- $\alpha$ /ng $\cdot$ L $^{-1}$
对照组	20.93 $\pm$ 3.51	36.50 $\pm$ 6.53	28.88 $\pm$ 3.23
$10^3$ CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ 刺激组	23.26 $\pm$ 1.21	36.55 $\pm$ 7.31	31.19 $\pm$ 3.62
$10^4$ CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ 刺激组	65.22 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>	120.82 $\pm$ 4.09 <sup>a</sup>	50.13 $\pm$ 2.93 <sup>a</sup>
$10^5$ CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ 刺激组	115.42 $\pm$ 3.37 <sup>a</sup>	201.50 $\pm$ 32.55 <sup>a</sup>	61.63 $\pm$ 8.59 <sup>a</sup>
$10^6$ CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ 刺激组	115.97 $\pm$ 2.20 <sup>a</sup>	218.40 $\pm$ 28.79 <sup>a</sup>	61.44 $\pm$ 7.28 <sup>a</sup>

注:与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

在镰刀菌和曲霉菌感染的 FK 患者角膜组织中, NOD2 mRNA 的相对表达量是正常角膜组织的上千倍<sup>[7]</sup>。有研究表明用灭活的烟曲霉菌孢子刺激 hCEC 可上调 NOD2 的表达<sup>[11]</sup>, 但尚无研究表明茄病镰刀菌在体外对 hCEC 中 NOD2 表达的影响。Jin 等<sup>[12]</sup>用灭活的茄病镰刀菌刺激 hCEC, 检测了各型 Toll 样受体 (TLRs) 的表达差异, 发现 TLR2、3、4、6 型 mRNA 及蛋白表达与对照组 (未用真菌刺激组) 比较均显著升高。又有研究表明 TLR 受体与 NOD2 受体



**图2  $10^5$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$  茄病镰刀菌孢子刺激不同时间 hCEC 中 NOD2 蛋白的表达变化**

之间亦存在直接联系,各型 TLR 受体的上调也会促进 NOD2 受体的表达<sup>[11,13-14]</sup>。因此,本研究用灭活的茄病镰刀菌孢子刺激 hCEC 进而检测 NOD2 表达具备充足的理论依据。

项目组先前的研究发现<sup>[15]</sup>,未加热灭活的茄病镰刀菌与尖端赛多孢子菌在体外不同糖浓度环境下均能够通过上调 hCEC 中 MMP-9 mRNA 和蛋白表达,进而增加真菌对 hCEC 的黏附作用。而本研究为排除真菌的毒性和黏附力的影响,采用灭活的茄病镰刀菌孢子作为抗原刺激 hCEC,发现灭活的真菌在体外亦能上调细胞中炎症因子的表达。随着灭活的茄病镰刀菌孢子刺激浓度的升高,hCEC 中 NOD2 mRNA 表达逐渐增加,10<sup>5</sup> CFU · mL<sup>-1</sup> 茄病镰刀菌孢子浓度刺激 8 h 可达峰值,而用该浓度的茄病镰刀菌孢子刺激 24 h NOD2 蛋白表达可达高峰。随着茄病镰刀菌孢子浓度的升高,与 NOD2 介导有关的下游相关炎症因子的表达亦可升高。因此,本研究结果表明,灭活的茄病镰刀菌孢子在体外能上调 hCEC 中 NOD2 mRNA 及蛋白的相对表达,并促进下游炎症因子 IL-6、IL-8、TNF-α 的蛋白表达。

角膜损伤是感染 FK 的首要因素<sup>[16]</sup>,当真菌入侵受损的角膜后,角膜缘血管活化并趋化中性粒细胞在内的炎症细胞参与对病原菌吞噬并介导炎症通路激活和炎症因子的释放。另外,hCEC 作为抗真菌固有免疫的第一道屏障也参与其中。NLRs 及其介导下游炎症通路激活的作用成为近年来研究的热点问题,以往 NLRs 在 FK 的发病机制中少有研究并认为其介导的炎症反应在 FK 中发挥次要作用,而近年来认为 NLRs 是参与 FK 的主要 PRRs<sup>[6,17]</sup>。有研究表明,用灭活的烟曲霉菌感染 hCEC 后,NOD2 mRNA 和蛋白表达峰值的时间点均小于本研究结果<sup>[11]</sup>,其原因可能是刺激菌种、真菌孢子浓度等的不同而造成的差异。通过比较烟曲霉菌及茄病镰刀菌对 NOD2 表达峰值时间的差异,可能对分析二者的病程及预后有一定意义。镰刀菌及曲霉菌感染的 FK 患者预后都较差,陈懿等<sup>[18]</sup>研究认为镰刀菌感染的患者相对于曲霉菌感染的患者药物治愈的所需时间更长,这可能与本研究中 hCEC 对茄病镰刀菌的识别、介导炎症反应时间较长有一定关系。

在治疗 FK 时除运用抗真菌药物外,糖皮质激素和免疫抑制剂的选用和使用时机一直以来是研究的热点问题<sup>[19]</sup>。炎症反应是清除病原菌的重要保护机制,而过度的炎症反应将导致角膜结构和功能的紊乱,影响角膜透光性,严重时导致溃疡穿孔和失明。FK 早期贸然应用免疫抑制药物将抑制中性粒细胞趋化导致感染扩散,甚至引起溃疡穿孔,而在炎症反应后期适时应用免疫抑制类药物将明显改善炎症相关细胞和因子对角膜的损伤。因此,对不同菌种造成角膜炎症反应时间峰值点的基础研究对 FK 临床诊治具有一定的意义。

综上所述,NOD2 参与了 hCEC 抗茄病镰刀菌的固有免疫过程,因此 NOD2 介导的炎症反应在 FK 中发挥重要作用,故而在控制真菌感染的炎症后期同时抑制 NOD2 表达可能对治疗 FK 的炎症反应有一定效果,NOD2 可能是治疗 FK 的新型靶分子。

### 参考文献

- [1] GHOSH A K, GUPTA A, RUDRAMURTHY S M, PAUL S, HAL-LUR V K, CHAKRABARTI A. Fungal keratitis in north India: Spectrum of agents, risk factors and treatment [J]. *Mycosporthologia*, 2016, 181 (11-12): 843-850.
- [2] XIE L X, ZHONG W X, SHI W Y, SUN S Y. Spectrum of fungal keratitis in north China [J]. *Ophthalmology*, 2006, 113 (11): 1943-1948.
- [3] 何健,程钧,董燕玲,谢立信. 真菌性角膜炎 1414 例临床分析 [J]. *中华眼科杂志*, 2020, 56 (4): 286-293.  
HE J, CHENG J, DONG Y L, XIE L X. Clinical analysis of 1414 cases of fungal keratitis [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2020, 56 (4): 286-293.
- [4] 白利广,夏建朴. 412 例真菌性角膜炎的回顾性分析 [J]. *中华眼视光学与视觉科学杂志*, 2019, 21 (11): 865-870.  
BAI L G, XIA J P. Retrospective analysis of 412 cases of fungal keratitis [J]. *Chin J Optom Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 21 (11): 865-870.
- [5] 石莲军,蒋沁,薛劲松. 苏皖地区 105 例真菌性角膜炎分析 [J]. *中华眼外伤职业眼病杂志*, 2018, 40 (10): 762-765.  
SHI L J, JIANG Q, XUE J S. Analysis of 105 cases of fungal keratitis in Jiangsu and Anhui areas [J]. *Chin J Ocul Traumat Occupat Eye Dis*, 2018, 40 (10): 762-765.
- [6] 陈芳,韩晓丽. 真菌性角膜炎中相关模式识别受体研究进展 [J]. *眼科新进展*, 2015, 35 (10): 993-996.  
CHEN F, HAN X L. Research progress on related pattern recognition receptors in fungal keratitis [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2015, 35 (10): 993-996.
- [7] KARTHIKEYAN R S, LEAL S M, PRAINA N V, DHARMALINGAM K, GEISER D M, PEARLMAN E. Expression of innate and adaptive immune mediators in human corneal tissue infected with *Aspergillus* or *fusarium* [J]. *J Infect Dis*, 2011, 204 (6): 942-950.
- [8] HU C F, SUN L P, HU Y L, LU D X, WANG H D, TANG S S. Functional characterization of the NF-kappaB binding site in the human NOD2 promoter [J]. *Cell Mol Immunol*, 2010, 7 (4): 288-295.
- [9] 渠晓黎,赵桂秋,许正杰,高昂,王楠,刘莹,等. 大鼠烟曲霉菌性角膜炎初期核苷酸结合寡聚域样受体在角膜中的表达及其免疫防御作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32 (10): 870-875.  
QU X L, ZHAO G Q, XU Z J, GAO A, WANG N, LIU Y, et al. Expression of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors in the cornea of rats with *aspergillus fumigatus* keratitis [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32 (10): 870-875.
- [10] ZHANG H J, QU J M, SHAO C Z, ZHANG J, HE L X, YUAN Z H. *Aspergillus fumigatus* conidia upregulates NOD2 protein expression both in vitro and in vivo [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29 (10): 1202-1208.
- [11] WU J Y, ZHANG Y T, XIN Z T, WU X Y. The crosstalk between TLR2 and NOD2 in *Aspergillus fumigatus* keratitis [J]. *Mol Immunol*, 2015, 64 (2): 235-243.
- [12] JIN X M, QIN Q, TU L L, ZHOU X T, LIN Y, QU J. 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.
- [13] TUKHVATULIN A, DZHARULLAIEVA A, EROKHOVA A, ZEMSKAVA A, BALVASSIN M, OZHAROVSKAIA T, et al. Adjuvantation of an influenza hemagglutinin antigen with TLR4 and NOD2 agonists encapsulated in poly (D, L-Lactide-Co-Glycolide) nanoparticles enhances immunogenicity and protection against lethal influenza virus infection in mice [J]. *Vaccines*, 2020, 8 (3): 519.
- [14] KASIMSETTY S G, HAWKES A, BAREKATAIN K, SOO E, WELCH A K, MCKAY D B. TLR2 and NODs1 and 2 cooperate in inflammatory responses associated with renal ischemia reperfusion injury [J]. *Transpl Immunol*, 2020, 58:

- 101260.
- [15] 朱然,梁舒,钱晶晶,李豪亮,张希熹.高糖和糖浓度波动对人角膜上皮细胞 MMP-9 表达及真菌黏附的影响[J].眼科新进展,2021,41(6):534-539.  
ZHU R,LIANG S,QIAN J J,LI H L,ZHANG X X.Effects of high glucose and fluctuating glucose on the expression of MMP-9 in human corneal epithelium cells and the adhesion of Fungi[J].*Rec Adv Ophthalmol*,2021,41(6):534-539.
- [16] 李雪弟.角膜外伤所致真菌性角膜炎误诊原因分析[J].中华眼外伤职业眼病杂志,1999,21(4):358.  
LI X D.Analysis of the causes of misdiagnosis of fungal keratitis caused by corneal trauma[J].*Chin J Ocul Traum Occupat Eye Dis*,1999,21(4):358.
- [17] 韦振宇,梁庆丰.真菌性角膜炎诊治新进展[J].中华眼科杂志,2020,56(8):631-636.  
WEI Z Y,LIANG Q F.New progress in diagnosis and treatment of fungal keratitis[J].*Chin J Ophthalmol*,2020,56(8):631-636.
- [18] 陈懿,冉莉君,徐燕,黄陆东晗,邓春霞,郑莎,等.真菌性角膜炎病原学及其预后[J].中华医院感染学杂志,2019,29(18):2830-2834.  
CHEN Y,RAN L J,XU Y,HUANG L D H,DENG C X,ZHENG S,*et al*.Etiology and prognosis of fungal keratitis[J].*Chin J Nosocomiol*,2019,29(18):2830-2834.
- [19] 向德猛,王月新,贾艳妮,李素霞,翟华蕾,史伟云,等.他克莫司滴眼液对真菌性角膜炎 PKP 术后早期免疫排斥预防作用的观察[J].中华眼科杂志,2017,53(4):305-310.  
XIANG D M,WANG Y X,JIA Y N,LI S X,ZHAI H L,SHI W Y,*et al*.Observation of the preventive effect of tacrolimus eye drops on early immune rejection after PKP operation of fungal keratitis[J].*Chin J Ophthalmol*,2017,53(4):305-310.

## Effect of *Fusarium solani* on the expression of NOD2 and the secretion of related inflammatory factors in human corneal epithelial cells

LI Haoliang, ZHU Ran, ZHANG Xixi, LU Zhifeng, QIAN Jingjing, LIANG Shu

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Corresponding author: LIANG Shu, E-mail: maggie7766@163.com

**[Abstract] Objective** To investigate the effect of *Fusarium solani* on the expression of NOD2 and the content of downstream inflammatory factors in human corneal epithelial cells (HCECs). **Methods** The HCECs in the logarithmic growth phase was divided into a control group (no fungal stimulation) and a fungal stimulation group (according to the concentration of added fungi, there were divided into  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  CFU · mL<sup>-1</sup> stimulation groups). The fungal stimulation group was stimulated 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, separately, and RT-qPCR was used to detect the expression of NOD2 mRNA in HCECs of each group. After HCECs were stimulated by  $10^5$  CFU · mL<sup>-1</sup> spores of *Fusarium solani* for 12 h, 24 h, 36 h, Western blot was used to detect the expression of NOD2 protein in each group. Cellular immunofluorescence was applied to detect NOD2 molecular location and its expression. After HCECs were stimulated by  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  CFU · mL<sup>-1</sup> *Fusarium solani* spores for 36 h, ELISA was used to detect the content of inflammatory factors, including IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  in the supernatant of HCEC culture in each group. **Results** As the stimulation concentration of *Fusarium solani* spores increased and the stimulation time prolonged, the expression level of NOD2 mRNA in HCECs gradually increased. After HCEC were stimulated by  $10^5$  CFU · mL<sup>-1</sup> *Fusarium solani* spores for 8 h, the relative expression level of NOD2 mRNA in HCECs reached a peak, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). After  $10^5$  CFU · mL<sup>-1</sup> *Fusarium solani* spores stimulated HCECs for 12 h, 24 h, 36 h, the relative expression level of NOD2 protein in HCECs gradually increased, and the difference was statistically significant compared with the control group (all  $P < 0.05$ ). After the spores of  $10^5$  CFU · mL<sup>-1</sup> *Fusarium solani* stimulated HCECs for 24 h, NOD2 was mainly expressed in the cytoplasm of HCECs, and the expression intensity of its fluorescent molecules increased significantly. As the stimulation concentration of *Fusarium solani* spores increased, the protein secretion level of related inflammatory factors in HCECs increased,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  CFU · mL<sup>-1</sup> *Fusarium solani* spores stimulated HCECs for 36 h, the differences in IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  protein secretion levels were statistically significant when compared with the control group (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** *Fusarium solani* spore stimulation can up-regulate the expression of NOD2 in HCEC and promote the expression of related inflammatory factors. NOD2 participates in the innate immune response of HCEC against *Fusarium solani*.

**[Key words]** *Fusarium solani*; inflammatory factors; human corneal epithelial cells; NOD2