

紫苏醛在烟曲霉菌性角膜炎中的保护作用

贺梦婷^{1,2}, 马玉娜², 吴媛², 马淑芹^{1,2}, 赵雪琪², 彭旭东^{2*}

¹青岛大学, 山东 青岛

²青岛大学附属医院, 山东 青岛

收稿日期: 2022年1月9日; 录用日期: 2022年2月3日; 发布日期: 2022年2月11日

摘要

目的: 探讨紫苏醛(PAE)对小鼠烟曲霉菌感染性角膜炎的保护作用及机制。方法: 我们使用烟曲霉菌感染的C57BL/6小鼠用于体内实验, 通过眼前节照相以及炎症评分来评估紫苏醛对于感染小鼠角膜的保护作用。苏木精-伊红(HE)染色用来观察紫苏醛对感染角膜中炎症细胞浸润的影响, 过碘酸希夫(PAS)染色观察紫苏醛对感染角膜组织中真菌负荷的影响。采用实时荧光定量PCR (RT-PCR)检测烟曲霉菌感染小鼠角膜及RAW264.7细胞中炎症因子IL-6、MIP-2、CXCL-1及模式识别受体TLR4 mRNA的表达。RT-PCR检测脂多糖(LPS)刺激的RAW264.7细胞中IL-6、MIP-2、CXCL-1的mRNA表达水平。结果: 烟曲霉菌感染的小鼠角膜经过紫苏醛处理后, 溃疡面积减小, 混浊程度减轻, 临床炎症评分下降。紫苏醛处理可抑制角膜中炎症细胞的浸润, 减轻真菌负荷。RT-PCR结果显示, 紫苏醛处理可及减少烟曲霉菌感染小鼠角膜和RAW264.7细胞中TLR4、IL-6、MIP-2、CXCL-1的mRNA表达水平。我们使用LPS特异性激动TLR4, 结果显示, 紫苏醛可以抑制由TLR4介导的下游炎症因子IL-6、MIP-2、CXCL-1的mRNA水平的升高。结论: 紫苏醛改善小鼠烟曲霉菌性角膜炎的预后, 减少炎症细胞的募集及真菌负荷。紫苏醛通过抑制TLR4介导的信号通路, 抑制下游炎症因子的释放。

关键词

紫苏醛, 烟曲霉菌, 角膜炎, 巨噬细胞, 炎症

Protective Effect of Perillaldehyde on *Aspergillus fumigatus* Keratitis

Mengting He^{1,2}, Yuna Ma², Yuan Wu², Shuqin Ma^{1,2}, Xueqi Zhao², Xudong Peng^{2*}

¹Qingdao University, Qingdao Shandong

²The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Jan. 9th, 2022; accepted: Feb. 3rd, 2022; published: Feb. 11th, 2022

*通讯作者 Email: doctorpxd@126.com

文章引用: 贺梦婷, 马玉娜, 吴媛, 马淑芹, 赵雪琪, 彭旭东. 紫苏醛在烟曲霉菌性角膜炎中的保护作用[J]. 临床医学进展, 2022, 12(2): 867-876. DOI: 10.12677/acm.2022.122125

Abstract

Objective: To explore the protective effect of perillaldehyde (PAE) on *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) keratitis in mice and the following mechanism. **Methods:** We used *A. fumigatus* infected C57BL/6 mice for the experiments *in vivo*. The protective effect of PAE on infected corneas was evaluated by anterior segment photography and clinical score. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the effect of PAE on the infiltration of inflammatory cells in infected corneas, and the fungal load in mice corneas was observed by Periodic Acid Schiff (PAS) staining. RT-PCR was used to detect the mRNA expression of inflammatory cytokines IL-6, MIP-2, CXCL-1 and pattern recognition receptor TLR4 in infected mice corneas and RAW264.7 cells. We also used RT-PCR to measure the mRNA expression of IL-6, MIP-2 and CXCL-1 in RAW264.7 cells stimulated by lipopolysaccharide (LPS). **Results:** PAE treatment remarkably decreased the area of ulcer, the degree of turbidity, and the clinical score of the mice corneas infected with *A. fumigatus*. PAE treatment could inhibit the infiltration of inflammatory cells and reduce the fungal load of the infected corneas. RT-PCR results showed that PAE could reduce the mRNA expression of TLR4, IL-6, MIP-2 and CXCL-1 in *A. fumigatus* infected corneas and RAW264.7 cells. We used LPS to specifically activate TLR4. The results showed that PAE pre-treatment could inhibit the mRNA levels of the downstream inflammatory factors IL-6, MIP-2 and CXCL-1 mediated by TLR4. **Conclusion:** PAE could improve the prognosis of *A. fumigatus* keratitis, reduce the infiltration of inflammatory cells and fungal load, and inhibit the release of inflammatory factors mediated by TLR4.

Keywords

Perillaldehyde, *Aspergillus fumigatus*, Keratitis, Macrophage, Inflammation

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

真菌性角膜炎是由曲霉菌和镰刀菌等真菌病原体引起的感染性眼病，可造成严重的视力损害[1]。植物相关外伤、角膜接触镜的过度使用、不规范使用广谱抗生素和激素都可能导致发病率增加[2]。中国是农业大国，植物性外伤更容易为真菌性角膜炎的发生和发展提供机会[3]。目前临床使用的抗真菌药物存在角膜局部渗透性差、眼部刺激性强、毒性较大等缺点[4]，导致真菌性角膜炎的治疗十分棘手。因此，寻找新的有效的抗真菌药物是临床亟待解决的问题。

真菌性角膜炎的发生和发展不仅包括真菌的直接损伤，而且与真菌入侵引起过度的炎症反应加重局部组织破坏密切相关[5]。固有免疫是机体抵抗真菌感染的第一道防线。当角膜被感染时，固有免疫被激活，真菌细胞壁中的病原体相关分子模式(PAMPs)会被模式识别受体(PRRs)识别，促进炎症细胞向病变部位浸润，介导下游的免疫炎症反应，产生炎症细胞因子，以抵抗病原体的侵袭[4] [6]。过度炎症反应诱导大量免疫细胞、炎症因子和细胞毒性物质在感染部位积累，可能加重角膜损伤并延迟愈合伤口，严重者造成角膜穿孔[7] [8]。因此，控制过度的炎症反应也是真菌性角膜炎的重要的治疗手段。

紫苏醛是紫苏中提取的主要成分,因其显著的抗真菌、抗炎、抗氧化等作用受到关注[9][10]。研究表明,紫苏醛间接干扰麦角甾醇的生物合成,导致真菌细胞膜的破坏,进而对黑曲霉菌起到杀菌作用[11];紫苏醛还可以通过半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶依赖性线粒体途径诱导黄曲霉凋亡[10]。同时,也有研究证明紫苏醛可以通过下调炎性小体的表达进而抑制 IL-1 β 和 IL-18 的分泌,减轻大鼠脊髓缺血再灌注损伤的炎症反应[12];通过减少中性粒细胞和巨噬细胞等炎症细胞数量,对阴道念珠菌病具有治疗作用[13]。这些研究为紫苏醛在真菌性角膜炎中的应用提供了基础。我们前期研究发现紫苏醛对烟曲霉性角膜炎有一定的治疗作用[14]。但是,其具体的机制还需要进一步探索。

本文探讨了紫苏醛在烟曲霉菌感染的角膜炎中的抗真菌、抗炎作用及其可能的机制。我们的研究表明,紫苏醛可以减轻真菌负荷,并且通过抑制 TLR4 介导的信号通路,来抑制炎症细胞因子的分泌。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

紫苏醛(CAS-No.18031-40-8)购自 TCI 株式会社(日本东京)。二甲基亚砜(DMSO)购自北京 Solarbio 公司。脂多糖(LPS)购自 Sigma-Aldrich (美国)。雌性 C57BL/6 小鼠(8 周龄)购自济南朋悦公司,经检验检疫均合格,全身情况良好。裂隙灯下观察小鼠,排除眼部疾患。实验动物使用符合美国眼科和视觉研究协会(ARVO)关于动物使用的标准。RAW264.7 细胞系从中国科学院(上海)获得。

2.2. 烟曲霉菌培养与菌丝的制备

将烟曲霉菌 3.0772 菌株(中国普通微生物菌种保藏管理中心),接种于 Sabouroud 琼脂固体培养基(Solarbio),置于恒温箱内孵育,待其生长良好时,于无菌超净操作台中用 PBS (含 0.1% Tween 20)冲洗培养基,收集孢子。洗涤、离心(4 $^{\circ}$ C、12,000 g、5 分钟)、弃上清、重悬,4 $^{\circ}$ C 保存。将标准烟曲霉菌菌株接种于经过高压消毒后的含 300 ml Sabouroud 液体培养基的无菌烧瓶内,纱布严密包扎瓶口。置于 37 $^{\circ}$ C 的 120 rpm 摇床培养箱中培养。当生长至团块状菌丝形态时,收集菌丝并研磨,PBS 洗涤、离心(4 $^{\circ}$ C、4500 rpm、10 分钟)、弃上清。菌丝中加入 75%的酒精吹打混匀后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜灭活菌丝。次日离心后弃上层酒精,PBS 洗涤 3 次。最后离心弃 PBS 上清,加入 DMEM 细胞培养液混匀,制成灭活菌丝悬液,调整菌丝最终使用浓度为 1×10^8 CFU/ml。

2.3. 真菌性角膜炎小鼠模型的建立

使用 8%水合氯醛(0.4 ml/kg)麻醉小鼠。在眼科手术显微镜下,使用 30 G 一次性注射器针头在小鼠右眼角膜做隧道,达角膜基质层,使用 10 μ L Hamilton 微量注射器将 2.5 μ L 孢子悬液(1×10^7 CFU/mL)注射至小鼠右眼角膜基质层,左眼作为空白对照组。将小鼠随机分为紫苏醛治疗组和 DMSO 治疗组,感染后第一天根据分组结膜下注射紫苏醛(6 mM)或者 DMSO (1%) 5 μ L,自感染后第二天,给予小鼠紫苏醛(6 mM)或者 DMSO (1%)每日 3 次点眼治疗。在建模后的第 1、3、5 天,裂隙灯下观察小鼠角膜病情变化并评估临床评分。评估标准与之前实验相同[15]。

2.4. HE 染色

将感染后 3 天小鼠眼球置于 OCT 包埋剂中,液氮速冻后制作冷冻切片,厚度为 10 μ m,37 $^{\circ}$ C 下烤片 2 小时。PBS 浸洗 3 遍,苏木精染色 8 分钟,自来水浸洗 3 遍,1%盐酸酒精分化 20 秒,自来水浸洗 3 遍,氨水中和 1 分钟,自来水浸洗 3 遍,伊红染色 30 秒,自来水浸洗 3 遍,入 85%、90%、95%、无水乙醇梯度脱水,二甲苯中透明 5 分钟,中性树胶封片。使用光学显微镜观察并拍照(400 \times)。

2.5. 过碘酸希夫(PAS)染色

将感染后 3 天小鼠眼球置于 OCT 包埋剂中,液氮速冻后制作冷冻切片,厚度为 10 μm , 37 $^{\circ}\text{C}$ 下烤片 2 小时。PBS 浸洗 3 遍,过碘酸溶液室温氧化 10 分钟,蒸馏水浸洗, Schiff Reagent 浸染 15 分钟,亚硫酸钠溶液滴洗 2 次,流水冲洗,苏木素染色 2 分钟,流水冲洗,乙醇梯度脱水,二甲苯中透明 5 分钟,封片。使用光学显微镜观察并拍照(400 倍)。

2.6. RAW 细胞处理

将接种于 12 孔板中的 RAW264.7 细胞于温箱培养至接近 80%融合,加入紫苏醛(600 μM)或 DMSO (0.1%)预处理 2 小时,给予灭活烟曲霉菌菌丝或者 LPS (100 ng/mL)刺激,感染 8 小时后收集细胞用于 RT-PCR 实验,检测 TLR4、IL-6、MIP-2、CXCL-1 的 mRNA 表达水平。

2.7. RT-PCR

2.7.1. Total RNA 的提取

将含有研磨后角膜组织或者 RAW264.7 细胞的 RNA 裂解液的 EP 管置于冰盒上裂解 30 分钟。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12,000 rpm 离心 10 分钟,取上清液入另一新的 EP 管中,加入与 RNA 裂解液 1/5 体积量相等的氯仿,混匀后,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12,000 rpm 离心 15 分钟,取上清液入另一新的 EP 管中;向装有上清液的 EP 管中加入异丙醇,混匀后,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12,000 rpm 离心 10 分钟,弃上清,加入 500 μl 75%乙醇,混匀后,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12,000 rpm 离心 10 分钟,弃上清,待乙醇挥发。向 EP 管中加入 DEPC 水溶解 RNA 沉淀,充分离心-振荡-离心后立刻测定 RNA 的含量及纯度。

2.7.2. Total RNA 含量及浓度测定

调整核酸浓度分析设备的 OD 值归 0,分别测样本在 260 nm、280 nm 处的 OD 值以及 OD260/OD280 比值,测量三次取平均值。根据 RNA 浓度计算上样量。

2.7.3. 逆转录

按照 Prime Script RTreagent Kit With gDNA Eraser (大连宝生物工程有限公司)试剂逆转录步骤,配置相应混合待测液,置 PCR 仪上进行基因扩增反应。条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s \rightarrow 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (40 个循环) \rightarrow 95 $^{\circ}\text{C}$ 退火、延伸 15 s \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s \rightarrow 95 $^{\circ}\text{C}$ 溶解 15 s。根据样本的内参及目的基因循环数,计算相对表达量。引物序列见表 1。

Table 1. Primer sequence of target gene

表 1. 目的基因引物序列

Gene	Primer	Nucleotide Sequence	GenBank
β -Actin (mouse)	F	GATTACTGCTCTGGCTCCTAGC	NM_007393.3
	R	GACTCATCGTACTCCTGCTTGC	
TLR4 (mouse)	F	CGCTTTCACCTCTGCCTTCACTACAG	NM_021297.3
	R	ACACTACCACAATAACCTTCCGGCTC	
IL-6 (mouse)	F	TGATGGATGCTACCAAAGTGGG	NM_001314054.1
	R	TGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG	
MIP2 (mouse)	F	TGTCAATGCCTGAAGACCCTGCC	NM_009140.2
	R	AACTTTTTGACCGCCCTTGAGAGTGG	
CXCL-1 (mouse)	F	TCACCTCAAGAACATCCAGAGC	NM_008176.3
	R	ACTTGGGGACACCTTTTAGCAT	

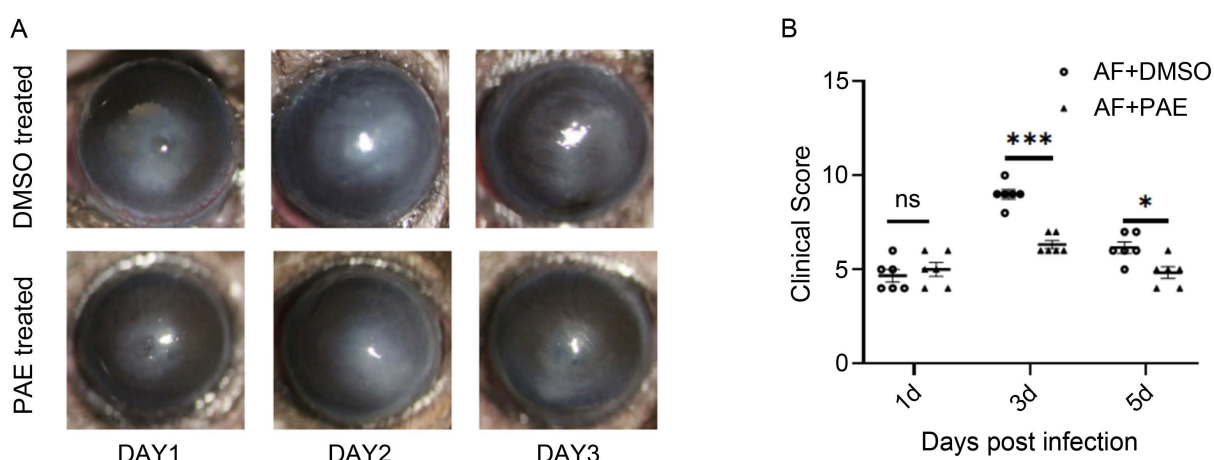
2.8. 统计学方法

实验数据以平均值 \pm SEM 的形式表示, 并通过 GraphPad 8.0 软件进行分析。通过 Mann-Whitney U 检验确定不同组的临床评分。用未配对双尾 t 检验对 RT-PCR 结果进行分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 被视为有统计学意义, ns 被视为无统计学意义。重复所有实验至少 3 次以确保准确性。

3. 结果

3.1. 紫苏醛减轻小鼠烟曲霉菌性角膜炎临床评分

小鼠角膜感染烟曲霉菌后第 1、3 和 5 天在裂隙灯下进行眼前节照相。与 DMSO 组相比, 紫苏醛处理显著减小溃疡面积和混浊程度(图 1(A))。临床评分显示, 感染后第 3 天和第 5 天, 紫苏醛治疗组评分明显低于 DMSO 对照组临床评分(图 1(B)), 差异有统计学意义。



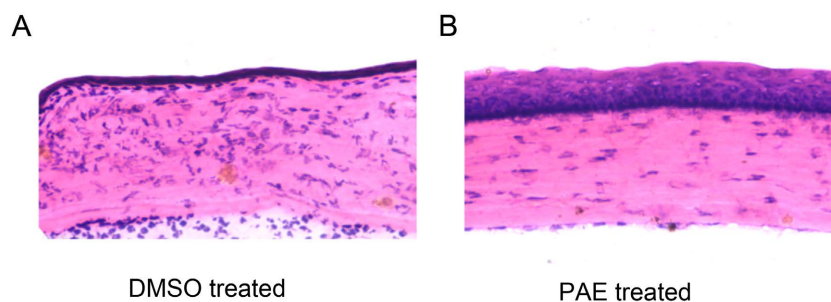
注: (A) 烟曲霉菌感染小鼠角膜 1、3、5 天后 DMSO 处理组与紫苏醛处理组眼前节照相; (B) 烟曲霉菌感染小鼠角膜 1、3、5 天后 DMSO 处理组与紫苏醛处理组临床评分比较($n = 6$ 组) (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, ns 被视为无统计学意义)。

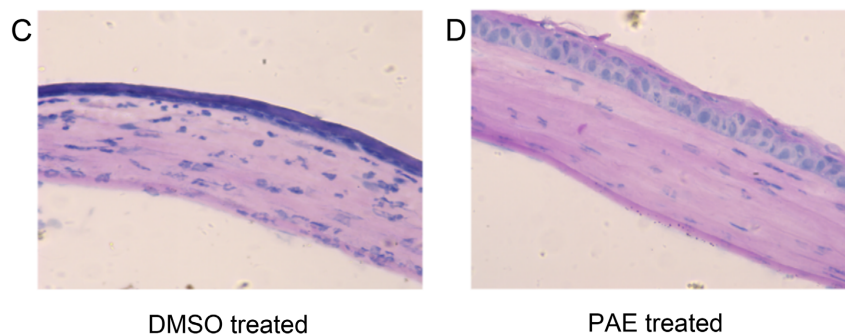
Figure 1. PAE treatment alleviated the severity of *A. fumigatus* (AF) keratitis in mice cornea

图 1. 紫苏醛处理减轻小鼠烟曲霉菌性角膜炎的严重程度

3.2. 紫苏醛抑制小鼠感染角膜组织中的炎症细胞浸润及真菌负荷

角膜组织切片 HE 染色显示, 感染后第 3 天, DMSO 组可见基质层中有大量炎性细胞浸润, 而紫苏醛治疗减少了炎性细胞的数量(图 2(A)、图 2(B))。通过 PAS 染色法可以检测感染角膜中的真菌负荷, 角膜组织切片的 PAS 染色显示, 在感染后第 3 天, 紫苏醛处理组角膜中菌丝含量明显低于 DMSO 对照组, 且角膜水肿程度减轻(图 2(C)、图 2(D))。





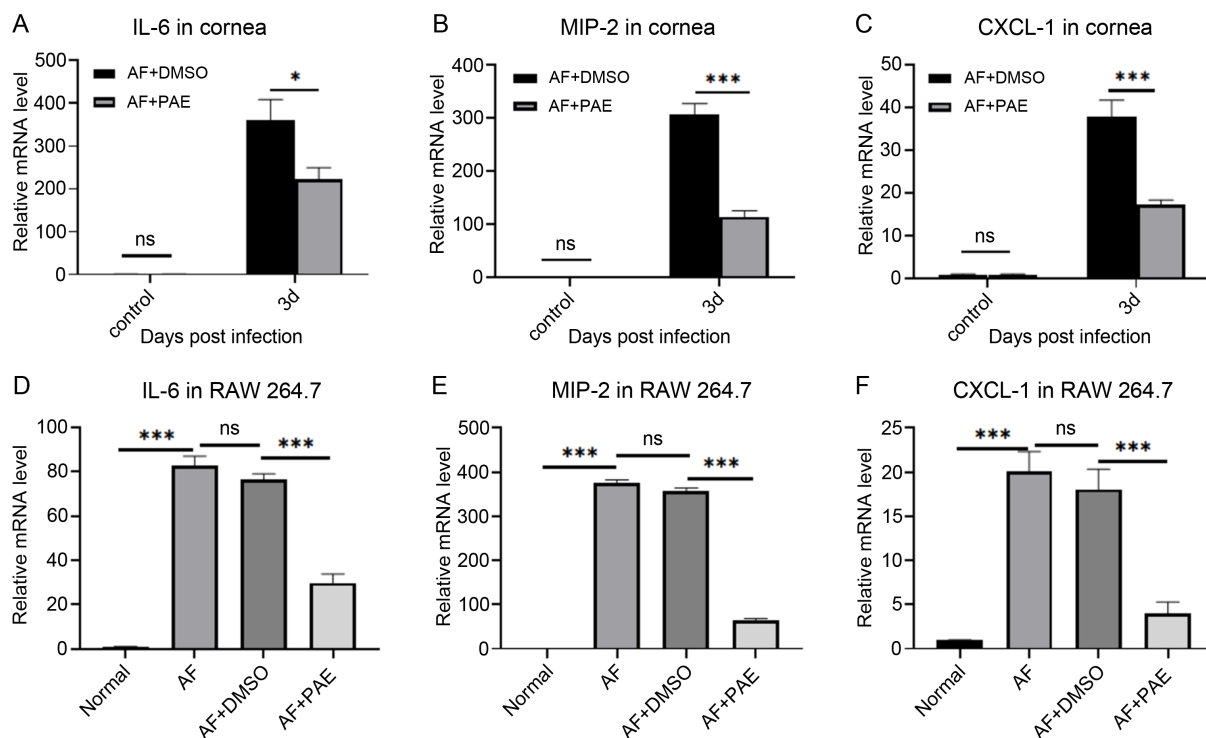
注：烟曲霉菌感染小鼠角膜 3 天后 DMSO 处理组(A)与紫苏醛处理组(B) HE 染色照片；烟曲霉菌感染小鼠角膜 3 天后 DMSO 处理组(C)与紫苏醛处理组(D) PAS 染色照片(n = 3, 400×)。

Figure 2. PAE treatment reduced inflammatory cells infiltration and fungal load of *A. fumigatus* (AF) keratitis in mice cornea

图 2. 紫苏醛处理减少小鼠烟曲霉菌角膜炎的炎性细胞浸润及真菌负荷

3.3. 紫苏醛降低小鼠烟曲霉菌角膜炎中促炎因子的表达

我们进一步检测了感染小鼠角膜中促炎细胞因子的表达。RT-PCR 结果显示，与对照组相比，紫苏醛在感染 3 天小鼠角膜中显著降低了炎症因子 IL-6、MIP-2、CXCL-1 的 mRNA 水平(图 3(A)~(C))，差别具有统计学意义。



注：烟曲霉菌感染小鼠角膜 3 天后，与 DMSO 处理组相比，紫苏醛处理组 IL-6、MIP-2、CXCL-1mRNA 水平降低(n = 6/组) (A~C)。烟曲霉菌感染 RAW264.7 细胞 8 小时后，与 DMSO 组相比，紫苏醛预处理组 IL-6、MIP-2、CXCL-1mRNA 水平降低(D~F) (*P < 0.05, ***P < 0.001, ns 被视为无统计学意义)。

Figure 3. PAE inhibited the mRNA levels of pro-inflammatory factors in the mice cornea and RAW264.7 cells infected with *A. fumigatus*

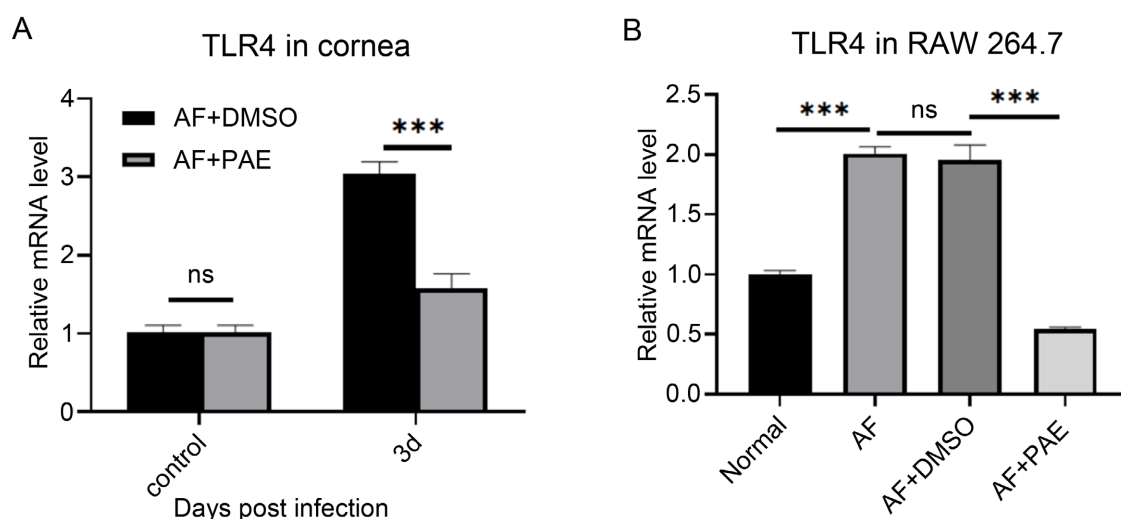
图 3. 紫苏醛处理抑制了烟曲霉菌感染小鼠角膜和 RAW264.7 细胞中促炎因子 mRNA 的表达

3.4. 紫苏醛降低 RAW264.7 细胞中促炎因子的表达

紫苏醛预处理 RAW264.7 细胞 2 小时后, 加入灭活烟曲霉菌刺激。RT-PCR 结果显示, 单纯烟曲霉菌处理组 IL-6、MIP-2、CXCL-1 的 mRNA 表达水平升高, 而紫苏醛预处理则显著降低了 IL-6、MIP-2、CXCL-1 的 mRNA 表达(图 3(D)-(F)), 差别具有统计学意义。

3.5. 紫苏醛抑制小鼠烟曲霉菌性角膜炎中 TLR4 的表达

为了探索紫苏醛抗炎的机制, 我们检测了烟曲霉菌感染小鼠角膜和 RAW264.7 中模式识别受体 TLR4 的表达, RT-PCR 结果提示, 相对于 DMSO 处理组, 紫苏醛处理组 TLR4 的 mRNA 表达量明显降低, 差别具有统计学意义(图 4)。



注: 烟曲霉菌感染小鼠角膜 3 天后, 与 DMSO 处理相比, 紫苏醛处理组 TLR4 mRNA 水平降低($n = 6/\text{组}$) (A)。烟曲霉菌感染 RAW264.7 细胞 8 小时后, 与 DMSO 组相比, 紫苏醛预处理组 TLR4 mRNA 水平降低(B) (** $P < 0.001$, ns 被视为无统计学意义)。

Figure 4. PAE inhibited the mRNA levels of TLR4 in the mice cornea and RAW264.7 cells infected with *A. fumigatus*
图 4. 紫苏醛处理抑制了烟曲霉菌感染小鼠角膜和 RAW264.7 细胞中 TLR4 的表达 mRNA 表达

3.6. 紫苏醛抑制 LPS 刺激的 RAW264.7 中促炎因子 mRNA 的产生

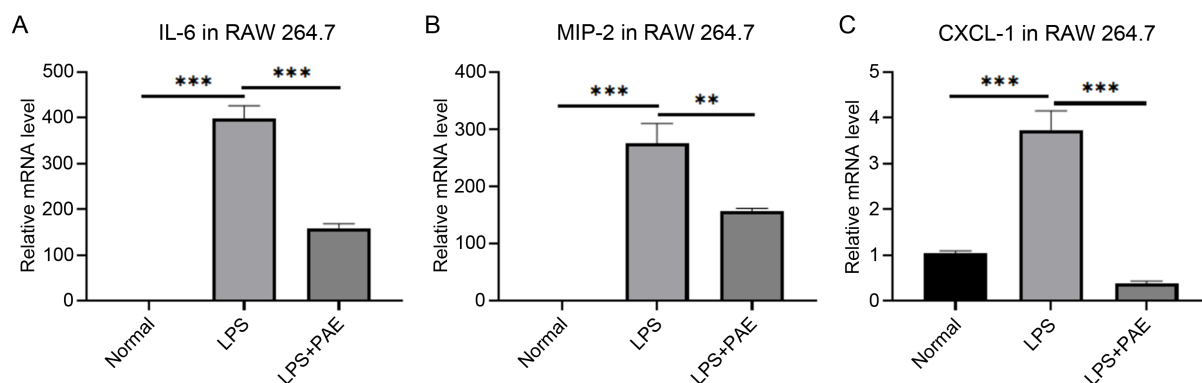
我们使用 TLR4 特异性激动剂 LPS 刺激 RAW264.7 细胞, 来检测下游因子的变化。RT-PCR 结果显示, 单独使用 LPS 处理组的细胞中 IL-6、MIP-2、CXCL-1 的 mRNA 水平升高, 而紫苏醛预处理显著降低了 LPS 刺激后升高的炎症因子水平, 差别具有统计学意义(图 5)。

4. 讨论

真菌性角膜炎是由一种由致病真菌引起的严重的致盲性疾病[16]。我国是农业大国, 真菌性角膜炎的发病率也居高不下[17]。目前, 临床应用的抗真菌药物特异性差, 缺乏抗炎作用[18], 极大地限制了它们的应用, 迫切需要找到高效、低毒的新型抗真菌药物。

紫苏醛是从紫苏中提取的天然单萜物质, 因其具有较强的抗真菌、抗炎、抗氧化等多种生物活性, 应用广泛[10] [19] [20]。本研究中, 我们验证了紫苏醛对于烟曲霉菌感染小鼠角膜的治疗作用。眼前节照相提示紫苏醛处理组的感染小鼠角膜与 DMSO 组相比, 水肿程度减轻、溃疡面积减小、虹膜纹理更加清晰, 对应的炎症评分也下降显著, 两组相比, 差距有统计学意义。HE 染色显示感染后第 3 天, 感染组角

膜水肿加重,伴有大量炎症细胞浸润,基质层纤维结构紊乱,经紫苏醛处理后的角膜中炎症细胞明显减少,组织结构较完整。已有研究证实紫苏醛可以减少感染白色念珠菌小鼠的阴道组织中中性粒细胞、巨噬细胞和 CD4 T 细胞数量,这与我们的研究一致[13]。我们前期对于紫苏醛的抗真菌作用研究发现,它可以抑制烟曲霉菌菌丝的数量并能影响其形态[14]。本实验中,我们通过 PAS 染色观察小鼠角膜切片,结果发现紫苏醛可以减少感染角膜中菌丝数量并且阻止菌丝向深层浸润,进一步证实了紫苏醛的抑真菌作用。为了验证紫苏醛的抗炎作用,我们在烟曲霉菌感染小鼠角膜中对炎症因子进行了检测,RT-PCR 结果显示,感染后的小鼠角膜中 IL-6、MIP-2、CXCL-1 表达增高,而紫苏醛处理会抑制它们的表达。MIP-2、CXCL-1 都属于 CXC 趋化因子家族,表现出强大的中性粒细胞、单核/巨噬细胞的趋化活性,协助多形核中性粒细胞(PMNs)招募到损伤或感染部位,从而调节免疫和炎症反应[21] [22]。紫苏醛对趋化因子的抑制,进一步验证了我们前期实验中紫苏醛可以减少烟曲霉菌感染角膜中的中性粒细胞的募集[14]。同样,在烟曲霉菌刺激的巨噬细胞中也检测到上述促炎因子的表达增加,而在紫苏醛处理后表达下调。这与最近的研究中紫苏醛能够通过抑制炎症因子 IL-6、TNF α 的产生来减缓 DSS 诱导的结肠炎的结果相一致[23]。



注: LPS 刺激 RAW264.7 细胞 8 小时后,与单纯 LPS 处理组相比,紫苏醛预处理组 IL-6、MIP-2、CXCL-1mRNA 水平降低(A-C) (**P < 0.01, ***P < 0.001, ns 被视为无统计学意义)。

Figure 5. PAE inhibited the mRNA levels of pro-inflammatory factors in the RAW264.7 cells stimulated by LPS

图 5. 紫苏醛处理抑制了 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中促炎因子 mRNA 的表达

在真菌性角膜炎固有免疫中,上皮细胞通过细胞表面的模式识别受体,如 Toll 样受体(TLRs)、C 型凝集素受体(CLRs)、核苷酸结合寡聚化域样受体(NLRs)等,识别真菌细胞壁表面的病原菌相关分子模式,进而介导级联炎症反应[24]。我们已有研究发现模式识别受体 TLR4 在烟曲霉菌感染后表达上升[25],提示在真菌性角膜炎过程中紫苏醛可能通过抑制 TLR4 的表达来抑制过度炎症。为此,我们使用特异性激动剂 LPS 来刺激 RAW264.7 细胞,结果显示紫苏醛处理显著降低了由 LPS 激发的 TLR4 介导的下游炎症介质的增加,提示紫苏醛可能通过抑制真菌诱导的 TLR4 信号通路来抑制促炎因子的表达。

综上所述,本实验进一步证实了紫苏醛在真菌性角膜炎中的抗真菌和抗炎作用,这可能与抑制 TLR4 及其介导的下游的炎症级联反应有关,提示紫苏醛可能成为治疗真菌性角膜炎行之有效的药物。

参考文献

- [1] Jiang, N., Zhao, G., Lin, J., Hu, L., Che, C., Li, C., *et al.* (2015) Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Involved in the Inflammation Response of Corneal Epithelial Cells to *Aspergillus fumigatus* Infections. *PLoS ONE*, **10**, e0137423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137423>
- [2] Garg, P., Roy, A. and Roy, S. (2016) Update on Fungal Keratitis. *Current Opinion in Ophthalmology*, **27**, 333-339.

- <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000272>
- [3] Xie, L., Zhong, W., Shi, W. and Sun, S. (2006) Spectrum of Fungal Keratitis in North China. *Ophthalmology*, **113**, 1943-1948. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2006.05.035>
- [4] van de Veerdonk, F.L., Gresnigt, M.S., Romani, L., Netea, M.G. and Latge, J.P. (2017) *Aspergillus fumigatus* Morphology and Dynamic Host Interactions. *Nature Reviews Microbiology*, **15**, 661-674. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.90>
- [5] Ruhnke, M. (2014) Antifungal Stewardship in Invasive Candida Infections. *Clinical Microbiology and Infection*, **20**, 11-18. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12622>
- [6] Li, C., Zhao, G., Che, C., Lin, J., Li, N., Hu, L., et al. (2015) The Role of LOX-1 in Innate Immunity to *Aspergillus fumigatus* in Corneal Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **56**, 3593-3603. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15989>
- [7] Snarr, B.D., St-Pierre, G., Ralph, B., Lehoux, M., Sato, Y., Rancourt, A., et al. (2020) Galectin-3 Enhances Neutrophil Motility and Extravasation into the Airways during *Aspergillus fumigatus* Infection. *PLoS Pathogens*, **16**, e1008741. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008741>
- [8] de Jesus Carrion, S., Abbondante, S., Clark, H.L., Marshall, M.E., Mouyna, I., Beauvais, A., et al. (2019) *Aspergillus fumigatus* Corneal Infection Is Regulated by Chitin Synthases and by Neutrophil-Derived Acidic Mammalian Chitinase. *European Journal of Immunology*, **49**, 918-927. <https://doi.org/10.1002/eji.201847851>
- [9] Tian, H., Qu, S., Wang, Y., Lu, Z., Zhang, M., Gan, Y., et al. (2017) Calcium and Oxidative Stress Mediate Perillaldehyde-Induced Apoptosis in *Candida albicans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **101**, 3335-3345. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8146-3>
- [10] Tian, J., Wang, Y., Lu, Z., Sun, C., Zhang, M., Zhu, A., et al. (2016) Perillaldehyde, a Promising Antifungal Agent Used in Food Preservation, Triggers Apoptosis through a Metacaspase-Dependent Pathway in *Aspergillus flavus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **64**, 7404-7413. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03546>
- [11] Tian, J., Wang, Y., Zeng, H., Li, Z., Zhang, P., Tessema, A., et al. (2015) Efficacy and Possible Mechanisms of Perillaldehyde in Control of *Aspergillus niger* Causing Grape Decay. *International Journal of Food Microbiology*, **202**, 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.022>
- [12] Zheng, W., Liu, B. and Shi, E. (2021) Perillaldehyde Alleviates Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury via Activating the Nrf2 Pathway. *Journal of Surgical Research*, **268**, 308-317. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2021.06.055>
- [13] Qu, S., Chen, L., Tian, H., Wang, Z., Wang, F., Wang, L., et al. (2019) Effect of Perillaldehyde on Prophylaxis and Treatment of Vaginal Candidiasis in a Murine Model. *Frontiers in Microbiology*, **10**, Article No. 1466. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01466>
- [14] Fan, Y., Li, C., Peng, X., Jiang, N., Hu, L., Gu, L., et al. (2020) Perillaldehyde Ameliorates *Aspergillus fumigatus* Keratitis by Activating the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway and Inhibiting Dectin-1-Mediated Inflammation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **61**, 51. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.6.51>
- [15] Gu, L., Lin, J., Wang, Q., Li, C., Peng, X., Fan, Y., et al. (2020) Dimethyl Itaconate Protects against Fungal Keratitis by Activating the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. *Immunology & Cell Biology*, **98**, 229-241. <https://doi.org/10.1111/imcb.12316>
- [16] FlorCruz, N.V., Peczon, I.V. and Evans, J.R. (2012) Medical Interventions for Fungal Keratitis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, **2012**, CD004241. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004241.pub3>
- [17] Hu, L.T., Du, Z.D., Zhao, G.Q., Jiang, N., Lin, J., Wang, Q., et al. (2014) Role of TREM-1 in Response to *Aspergillus fumigatus* Infection in Corneal Epithelial Cells. *International Immunopharmacology*, **23**, 288-293. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.09.011>
- [18] Niu, Y., Zhao, G., Li, C., Lin, J., Jiang, N., Che, C., et al. (2018) *Aspergillus fumigatus* Increased PAR-2 Expression and Elevated Proinflammatory Cytokines Expression through the Pathway of PAR-2/ERK1/2 in Cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **59**, 166-175. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-21887>
- [19] Ueda, H. and Yamazaki, M. (2001) Anti-Inflammatory and Anti-Allergic Actions by Oral Administration of a Perilla Leaf Extract in Mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **65**, 1673-1675. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.1673>
- [20] Pan, C., Li, Y.X., Yang, K., Famous, E., Ma, Y., He, X., et al. (2020) The Molecular Mechanism of Perillaldehyde Inducing Cell Death in *Aspergillus flavus* by Inhibiting Energy Metabolism Revealed by Transcriptome Sequencing. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 1518. <https://doi.org/10.3390/ijms21041518>
- [21] Qin, C.C., Liu, Y.N., Hu, Y., Yang, Y. and Chen, Z. (2017) Macrophage Inflammatory Protein-2 as Mediator of Inflammation in Acute Liver Injury. *World Journal of Gastroenterology*, **23**, 3043-3052. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i17.3043>
- [22] De Filippo, K., Dudeck, A., Hasenberg, M., Nye, E., van Rooijen, N., Hartmann, K., et al. (2013) Mast Cell and Ma-

- crophage Chemokines CXCL1/CXCL2 Control the Early Stage of Neutrophil Recruitment during Tissue Inflammation. *Blood*, **121**, 4930-4937. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-486217>
- [23] Chen, L., Qu, S., Yang, K., Liu, M., Li, Y.X., Keller, N.P., *et al.* (2020) Perillaldehyde: A Promising Antifungal Agent to Treat Oropharyngeal Candidiasis. *Biochemical Pharmacology*, **180**, Article ID: 114201. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114201>
- [24] Xu, Q., Zhao, G., Lin, J., Wang, Q., Hu, L. and Jiang, Z. (2015) Role of Dectin-1 in the Innate Immune Response of Rat Corneal Epithelial Cells to *Aspergillus fumigatus*. *BMC Ophthalmology*, **15**, Article No. 126. <https://doi.org/10.1186/s12886-015-0112-1>
- [25] Tian, X., Peng, X., Lin, J., Zhang, Y., Zhan, L., Yin, J., *et al.* (2021) Isorhamnetin Ameliorates *Aspergillus fumigatus* Keratitis by Reducing Fungal Load, Inhibiting Pattern-Recognition Receptors and Inflammatory Cytokines. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **62**, 38. <https://doi.org/10.1167/iovs.62.3.38>