

# 没食子酸在烟曲霉菌诱导的真菌性角膜炎中的抗炎作用

栾淞莹, 战璐, 彭旭东\*

青岛大学附属医院, 山东 青岛

收稿日期: 2022年1月16日; 录用日期: 2022年2月9日; 发布日期: 2022年2月18日

## 摘要

没食子酸(gallic acid, GA)具有抗炎、抗氧化、抑菌、抗病毒、抗肿瘤、心血管保护等多种生物活性,并且广泛用于医药、食品等领域。本文就GA对烟曲霉菌菌丝诱导的人角膜上皮细胞炎症反应及对小鼠真菌性角膜炎的治疗作用进行相关研究。方法:体外实验用烟曲霉菌菌丝感染人角膜上皮细胞后,再用GA处理,PCR、ELISA方法检测IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、LOX-1的mRNA及蛋白的表达。体内实验用烟曲霉菌孢子感染C57BL/6小鼠角膜建立烟曲霉菌角膜炎模型,然后使用GA或PBS处理,比较两组的临床表现并进行炎症评分以比较两者差异。结果:GA降低了烟曲霉菌诱导的人角膜上皮的炎症反应中的IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、LOX-1的表达,且改善真菌性角膜炎小鼠角膜的炎症程度。结论:GA抑制真菌菌丝诱导的人角膜上皮的炎症因子表达,改善真菌性角膜炎小鼠角膜的炎症程度评分。

## 关键词

没食子酸, 烟曲霉菌, 人角膜上皮细胞, 炎症

# Anti-Inflammatory Effects of Gallic Acid against Fungal Keratitis Induced by *Aspergillus fumigatus*

Songying Luan, Lu Zhan, Xudong Peng\*

The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Jan. 16<sup>th</sup>, 2022; accepted: Feb. 9<sup>th</sup>, 2022; published: Feb. 18<sup>th</sup>, 2022

## Abstract

Gallic acid (GA) has various biological activities such as anti-inflammatory, antioxidant, bacte-

\*通讯作者 Email: drpxd@uw.edu

文章引用: 栾淞莹, 战璐, 彭旭东. 没食子酸在烟曲霉菌诱导的真菌性角膜炎中的抗炎作用[J]. 临床医学进展, 2022, 12(2): 1080-1089. DOI: 10.12677/acm.2022.122159

riostatic, anti-viral, anti-tumor, cardiovascular protection, etc., and is widely used in medicine, food and other fields. In our study, we focus on the therapeutic effect of GA on the inflammatory response of human corneal epithelial cells induced by *Aspergillus fumigatus* hyphae and on the mice fungal keratitis. Methods: *In vitro* experiments, human corneal epithelial cells were infected by *Aspergillus fumigatus* hyphae and treated with GA, the expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and LOX-1 was detected by PCR and ELISA. *In vivo* experiments, *Aspergillus fumigatus* keratitis model was made by infected the cornea of C57BL/6 mice with *Aspergillus fumigatus*, and then treated with GA or PBS. The clinical manifestations of the two groups were compared and the clinical score was marked to quantify the differences. Results: GA reduced the expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and LOX-1 in the inflammatory response of human corneal epithelium induced by *Aspergillus fumigatus* and improved the degree of inflammation of the cornea in mice with fungal keratitis. Conclusion: GA inhibited the expression of inflammatory factors in the human corneal epithelium induced by fungal hyphae and improved the inflammation degree of fungal keratitis mice cornea.

## Keywords

Gallic Acid, *Aspergillus fumigatus*, HCECs, Inflammatory

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(Fungal keratitis, FK)是一种由致病真菌引起的严重角膜感染性疾病,在中国的发病率逐年增加[1] [2]。因为我国是农业大国,而真菌性角膜炎的发生主要是由于农业活动中植物划伤角膜损伤所致,同时皮质类固醇的广泛应用和隐形眼镜的磨损也越发成为重要的危险因素[3]。最常见的致病菌种是丝状真菌如镰刀菌属和曲霉菌属[4]。然而,目前临床上最常用的抗真菌药物(例如两性霉素 B 和纳他霉素)具有显著的局限性,如通透性较差、几乎不能穿透完整的角膜上皮、价格昂贵等[5],并且也无法解决过度的炎症反应导致角膜基质破坏、角膜通透性下降等问题,这些因素限制了这些药物的广泛应用[6]。此外,手术存在免疫排斥、供体缺乏等问题也是真菌性角膜炎治疗的棘手问题[7]。由于缺乏有效的抗真菌药物,真菌性角膜炎感染最终将发展成一种威胁视力的疾病,甚至导致视力丧失[8] [9]。因此,我们急需寻找一种安全无毒、有效的治疗真菌性角膜炎的药物。

当真菌开始入侵机体时,激活固有免疫系统,通过识别真菌的病原体相关分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)的模式识别受体(Pattern recognition receptors, PRRs)识别并消除真菌,然后募集嗜中性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞并激活信号级联反应、促进炎症因子的分泌[10]。在炎症反应后期,嗜中性粒细胞参与具有抗炎和前驱化活性的脂质介质的跨细胞生物合成,如脂氧蛋白、解蛋白和保护素,调节炎症反应[11]。IL-1 $\beta$ 是一种众所周知的促炎细胞因子,主要由活化的单核-巨噬细胞产生,通过刺激 MyD88 途径激发炎症[12]。TNF- $\alpha$  通过 NF- $\kappa$ B 信号传导起作用,介导角膜抗真菌免疫中的急性炎症反应[13]。LOX-1 属于 C 型凝集素家族,其构成 PRRs 的模式识别受体之一,此外,PRRs 还包括 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)和核苷酸结合齐聚结构域样受体(Nucleotides bind to polymeric structures and like receptors, NLRs)等,均在角膜抗真菌免疫反应中起着重要作用[14]。已有多项研究发现真菌性角膜炎中 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LOX-1 表达升高,而抑制 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LOX-1 的表达会减轻真菌性角膜炎的炎症反应[15] [16] [17]。

GA 是一种天然的次生代谢物,广泛存在于各种水果、植物和坚果中[18]。作为我国传统中药材五倍子、石榴、掌叶大黄等的主要成分之一,GA 是化学结构最简单的天然多酚类化合物。具有抗炎、抗氧化、抑菌、抗病毒、抗肿瘤、心血管保护等多种生物活性[19] [20] [21] [22],并且广泛用于医药、食品等领域,具有很大的应用价值。目前已有研究证明 GA 在类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞中可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 的活性来激活 cAMP 激活的 AMPK/SIRT1/NF-PDE B 信号通路,诱导凋亡并抑制促炎基因表达[23]。但目前尚未有 GA 在真菌性角膜炎中是否发挥抗炎作用的研究。本文将针对 GA 在烟曲霉菌诱导人角膜上皮细胞炎症中的作用及在小鼠烟曲霉菌性角膜炎中是否发挥抗炎作用进行研究。

## 2. 实验材料

### 2.1. 实验物品

#### 2.1.1. 实验真菌

烟曲霉菌购买于中国微生物菌种保藏管理中心,属于标准烟曲霉菌菌株,编号:3.0772。

#### 2.1.2. 实验细胞

获得于厦门眼科中心,属于人永生化角膜上皮细胞株(Human corneal epithelial cells, HCECs), PCS-700-010。

#### 2.1.3. 实验动物

购自斯贝福生物科技有限公司(北京)SPF 级雌性 C57BL/6 (7~8 周龄)小鼠,实验前检查小鼠眼部情况确保眼部健康,实验动物的使用均符合美国眼科和视觉研究协会 The Association for Research in Vision and Ophthalmology 关于在眼科和视觉研究中动物使用的原则和标准。

### 2.2. 实验耗材

#### 2.2.1. 细胞及真菌培养所需实验耗材

磷酸盐缓冲液粉末(PBS)、Sabouroud Medium (沙氏培养基),北京 Solarbio 公司;6 孔、12 孔细胞培养板,美国 Corning 公司;Tween 20、Tween 80,美国 Sigma-Aldrich 公司。

#### 2.2.2. 构建动物模型相关耗材与试剂

8%水合氯醛,青岛大学附属医院提供;1 ml 注射器,山东新华安得医疗用品有限公司;微量注射器(10  $\mu$ l),瑞士 Hamilton 公司。

#### 2.2.3. 实验用药

没食子酸(Gallic acid, GA),麦克林生化有限公司。

#### 2.2.4. Real-Time PCR 相关试剂及耗材

RNAiso Plus,日本 TaKaRa 有限公司;EP 管,美国 Corning 公司;Tip 枪头,美国 Corning 公司;八联排,美国 Axygen 公司;氯仿,青岛捷隆化工有限公司;异丙醇,南京宏益化学试剂有限公司;无水乙醇,江苏强盛功能化学股份有限公司;DEPC 水,上海生物工程有限公司;TBGreen,大连宝生物工程有限公司;Prime Script RT reagent kit 日本, TaKaRa 有限公司。

#### 2.2.5. Elisa 相关试剂及耗材

小鼠的 IL-1 $\beta$  酶联免疫吸附测定试剂盒,美国 R&D Systems 公司;小鼠的 TNF- $\alpha$  酶联免疫吸附测定试剂盒,美国 R&D Systems 公司。

## 2.3. 实验方法

### 2.3.1. 烟曲霉菌的孢子和菌丝培养与制备

孢子：于-80℃冰箱取出冻存的标准烟曲霉菌菌株，接种于 Sabouroud 培养基上，于恒温 28℃ 孵育 5 天，当烟曲霉菌生长状态良好且布满整个培养基时，在无菌超净操作台上使用 PBS 缓冲液冲洗培养基，并用细胞刮刮取、收集孢子，过滤后用计数板计数，将浓度调整为  $3 \times 10^7$  个/ml。

菌丝：将 Sabouroud 琼脂固体培养基上长出的菌丝接种于 Sabouroud 培养液中，置于转速为 120 rpm、温度为 37℃ 的摇床中孵育 7 天，待菌丝为团块状时进行菌丝收集。研磨菌丝，洗涤、离心(4℃、4500 rpm、15 分钟)、弃上清液，使用无菌磷酸盐缓冲液清洁重复 3 次，在菌丝中加入 75%乙醇，4℃ 存放 8 小时到 16 小时即可制备灭活菌丝。重悬后计数板计数，将浓度调整为  $1 \times 10^8$  个菌丝/ml。

### 2.3.2. 真菌性角膜炎小鼠模型

腹腔注射 8%水合氯醛(0.4 ml/kg)麻醉 30 只小鼠。用胰岛素针头在小鼠角膜中央做一微小缺口，深度达角膜基质层，2.5  $\mu$ L 孢子悬液( $3 \times 10^7$  个/mL)通过微量注射器(10  $\mu$ L Hamilton)注射至小鼠右眼角膜基质层。左眼不予任何处理为空白对照组。完成基质内注射约 4 小时，实验组右眼给予 GA 溶液(100  $\mu$ g/mL)局部滴眼治疗，对照组右眼同时给予 PBS 滴眼，两组左眼不给予处理。局部滴眼治疗一日三次，共五日疗程。在建模后的第 1、3、5 天于裂隙灯下观察小鼠角膜炎症情况，并拍摄小鼠眼前节照片。参考 WU [24] 等人的评分标准进行临床评分。

### 2.3.3. HCEC 细胞处理

将 HCEC 细胞接种于 12 孔板上，分为 4 组：1) 正常组；2) GA 处理组；3) 烟曲霉菌处理组；4) 烟曲霉菌 + GA 组，每组设置 3 孔。将细胞置于恒温箱中培养，当细胞生长状态良好，且融合率达 80%左右时，加入预先准备好的灭活烟曲霉菌菌丝( $3 \times 10^6$  个菌丝/ml)，使用菌丝刺激细胞 1 小时后，再分别加入 100  $\mu$ g/ml 的 GA 或 PBS，菌丝刺激 8 小时后收集细胞及细胞上清于 EP 管中，通过 RT-PCR、ELISA 实验，检测 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 LOX-1 的表达。

### 2.3.4. RT-PCR 实验方法

#### 1) 提取 Total RNA

① 500  $\mu$ l RNA 裂解液分别加入到将 12 孔板 HCEC 细胞中裂解 30 分钟。

② 将收取的样本于 4℃、12,000 rpm、离心 10 分钟，将上清液移至新的 EP 管中。

③ 加入约 100  $\mu$ l 三氯甲烷，上下颠倒混匀，室温下 5 分钟，于 4℃、12,000 rpm、离心 15 分钟。

④ 离心后可见样本分为三层，小心吸取上层液体移入新的 EP 管中，注意不要吸入中间蛋白层。

⑤ 加入约 200  $\mu$ l 异丙醇，上下颠倒混匀，室温下 10 分钟，再次于 4℃、12,000 rpm、离心 10 分钟。

⑥ 离心后的液体弃上清液，即可得到 RNA 沉淀。

⑦ 加入约 500  $\mu$ l 75%的乙醇，充分洗涤 RNA 沉淀，于 4℃、12,000 rpm、离心 10 分钟，弃上清液，得到 RNA 沉淀。

⑧ 干燥待乙醇蒸发，向 EP 管内加入 10  $\mu$ l DEPC 水，振荡 - 离心 - 振荡，使 RNA 完全溶解于 DEPC 水，即刻测定 RNA 的含量、浓度。

#### 2) Total RNA 含量及浓度测定

① 核酸蛋白分析仪的 OD 值(optical density, OD)调零。

② 从 EP 管内吸取 1  $\mu$ l 样本，分别于 260 nm、280 nm 处测定 OD 值，并记录 OD260/OD280 的比值 R，每个样本测量三次，取平均值。

③ 根据测得的数值计算建立 2 μg RNA 定量反应体系中所需的样本溶液体积。

3) 逆转录反应

逆转录反应按照逆转录试剂盒说明书进行。

4) PCR

① 将待测液充分混合，加入八连排，离心 - 振荡 - 离心，注意不要触碰八连排顶部以防止影响吸光度测定。PCR 反应体系见表 1。引物序列见表 2。

② 将八连排放入 PCR 仪，进行扩增反应。

③ 反应结束后，根据内参及目的基因循环数，计算 mRNA 相对表达量。

**Table 1.** PCR reaction system

**表 1.** PCR 反应体系

试剂	试剂量
上游 PCR 引物	0.5 μl
下游 PCR 引物	0.5 μl
TBGeen	10 μl
DEPC 水	7 μl
cDNA 模板	2 μl

**Table 2.** Primer sequences used for RT-PCR

**表 2.** RT-PCR 实验中所用的引物序列

Gene	Primer	Nucleotide Sequence
β-actin (human)	F	5'-CGC GAG AGA AGA TGA CCC AGA TC-3'
	R	5'-GCC AGA GGC GTA CAG GGA TA-3'
IL-1β (human)	F	5'-ATG CAC CTG TAC GAT CAC TGA-3'
	R	5'-ACA AAG GAC ATG GAG AAC ACC-3'
TNF-α (human)	F	5'-GAA CCC CGA GTG ACA AGC CTG-3'
	R	5'-TCA GCT CCA CGC CAT TGG CCA-3'
LOX-1 (human)	F	5'-TTA CTC TCC ATG GTG GTG GTG CC-3'
	R	5'-AGC TTC TTC TGC TTG TTG CC-3'

F: forward; R: reverse.

**2.3.5. ELISA 实验方法**

收集 12 孔板 HCEC 细胞每孔的上清液于 EP 管中，按照 ELISA 试剂盒的说明书进行实验：分别设空白孔、不同浓度梯度的标准孔、待测样品孔。96 孔板中加入 Capture Antibody 室温下孵育过夜。弃去液体，加入 Wash Buffer，浸泡 1~2 分钟，拍干，重复洗板 3 次。加入 Reagent Diluent 在室温下孵育 1 小时。洗涤 3 次。加入标准品工作液以及样本，注意不要有气泡，加样时尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。室温孵育 2 小时。洗涤 3 次。加入 Detection Antibody 室温下孵育 2 小时。洗涤 3 次。加入 Streptavidin-HRP 在室温避光下孵育 20 分钟。洗涤 3 次。加入 Substrate Solution 在室温避光下孵育 20 分钟。当一半数量



的标准孔出现明显的蓝色梯度时终止反应。迅速加入 Stop Solution 终止反应，立即用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度(OD)值。根据 OD 值，计算样品的蛋白浓度。

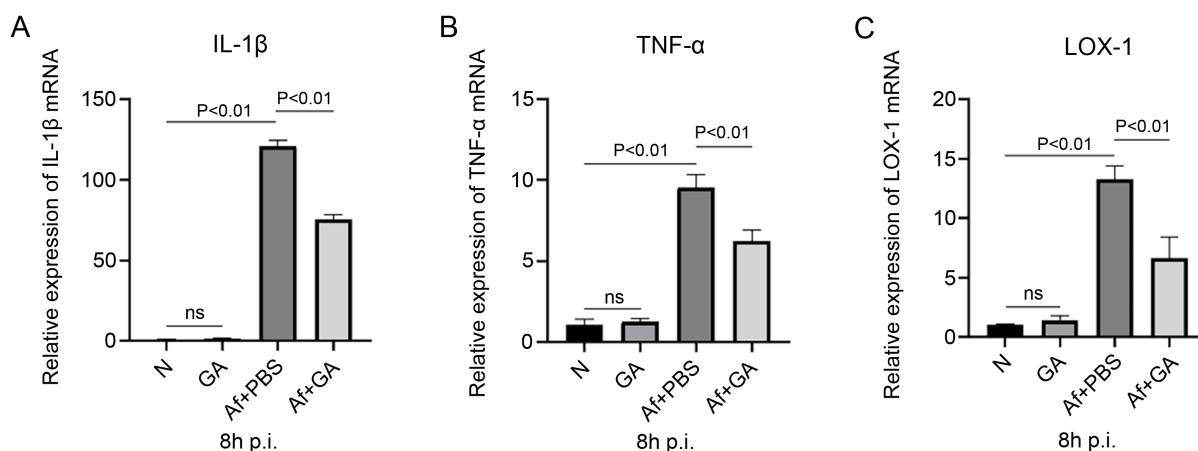
## 2.4. 统计学方法

实验数据通过  $x \pm s$  (SEM)来表示。每项实验独立重复 3 次。两组之间的数据比较采用 Mann-Whitney U 检验。三组或三组以上的数据比较采用单因素方差分析。应用 GraphpadPrism 3.0 统计软件， $P < 0.05$  有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. GA 在基因水平抑制烟曲霉菌诱导的 HCECs 细胞炎症因子的表达

RT-PCR 的结果显示，单纯 GA 处理组与正常组各炎症因子表达量无明显变化，烟曲霉菌感染 HCECs 细胞组中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 LOX-1 表达量都较正常组有明显升高，说明烟曲霉菌诱导了 HCECs 中炎症的发生，而烟曲霉菌感染后加 GA 处理组的各炎症因子与单纯加菌组相比有显著下调(图 1(A)-(C))，说明 GA 在人角膜上皮细胞中抑制烟曲霉菌诱导的炎性细胞因子的产生，抑制炎症表达。



注：(A)~(C) 烟曲霉菌感染 HCECs 后，GA 处理组中各炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、LOX-1 的 mRNA 表达量显著低于 PBS 处理组(n = 6 组)。

**Figure 1.** The mRNA expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and LOX-1 in the GA and PBS treatment group after stimulation of *A. fumigatus*

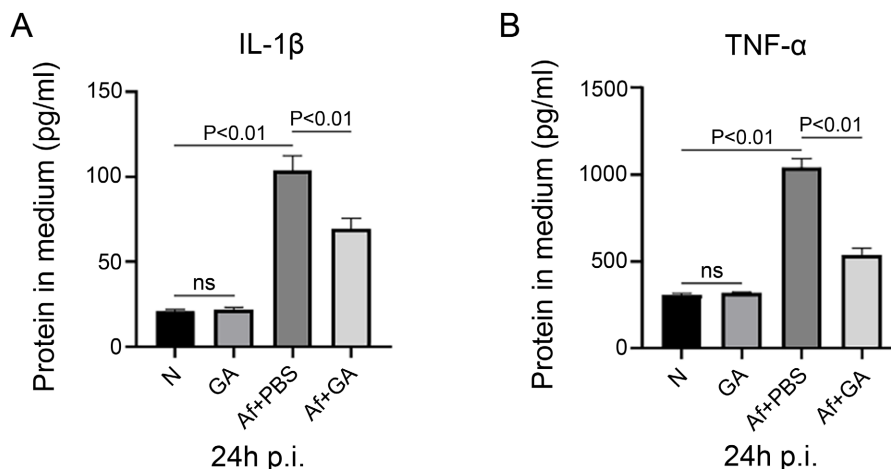
**图 1.** 烟曲霉菌菌丝刺激 HCECs 后 GA 处理组与 PBS 处理组 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 LOX-1 的 mRNA 表达

### 3.2. GA 在蛋白水平抑制烟曲霉菌诱导的 HCECs 细胞炎症因子的表达

ELISA 的实验结果在蛋白水平揭示了炎症因子的表达，GA 能够下调因烟曲霉菌感染 HCECs 导致的炎症反应而升高的相关炎症因子如 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  (图 2(A)、图 2(B))，进一步验证了 GA 在人角膜上皮细胞中抑制烟曲霉菌诱导的炎性细胞因子蛋白水平的表达，抑制炎症。

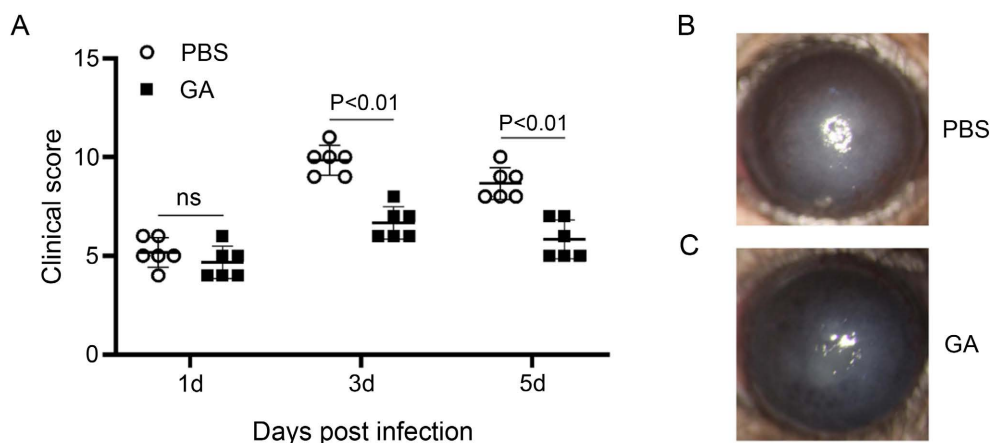
### 3.3. GA 处理能降低真菌性角膜炎小鼠的临床评分

在真菌性角膜炎小鼠模型中，GA 处理组在第 3、5 天的临床炎症评分明显低于 PBS 处理组(图 3(A))。在第 3 天时，GA 处理组比 PBS 处理组的角膜溃疡面积更小、深度更浅，透明度更高，且角膜水肿也相对减轻(图 3(B)、图 3(C))。提示 GA 可以缩小真菌性角膜炎小鼠的角膜溃疡面积、降低溃疡深度、提高角膜透明度，从而降低炎症的临床评分。



注: (A)、(B) 烟曲霉菌感染 HCECs 后, GA 处理组中各炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的蛋白表达量显著低于 PBS 处理组 (n = 6 组)。

**Figure 2.** The protein expression of IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  in the GA and PBS treatment group after stimulation of *A. fumigatus*  
**图 2.** 烟曲霉菌菌丝刺激 HCECs 后 GA 处理组与 PBS 处理组 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的蛋白表达



注: (A) 在第 3、5 天, 用 GA 治疗的小鼠烟曲霉性角膜炎的临床评分显著低于 PBS 治疗组 (n = 6 组)。(B)、(C) 烟曲霉菌感染小鼠角膜的第 3 天, GA 或 PBS 治疗小鼠角膜的代表性裂隙灯照片。

**Figure 3.** The clinical scores of GA in the treatment of *A. fumigatus* keratitis in mice  
**图 3.** GA 治疗小鼠烟曲霉菌性角膜炎的临床评分

#### 4. 讨论

当病原微生物入侵时, 机体能够识别和内化来自组织微环境的凋亡细胞和外来病原体, 活化免疫细胞以启动炎症反应[25]。炎症本质来说是机体的抵抗反应, 在初期往往起到积极作用, 例如当炎性充血时, 可增加局部组织血流量, 使组织得到更多的氧气、营养物质等, 使组织代谢和抗力增加[26]; 同时血流量的增加还可产生更多的渗出液, 因此能够稀释病原体释放的毒素, 其中所含的抗体还能够清除病原体并中和毒素[27]; 除此以外, 活化的免疫细胞如中性白细胞和巨噬细胞能够吞噬病原体及坏死崩解的细胞碎屑[28]。然而, 由病原微生物入侵机体导致的炎症级联反应在后期往往对机体是不利的, 免疫细胞产生的炎症因子介导的直接损伤和免疫细胞的趋化募集是组织发生过度炎症反应的重要原因[29]。例如在真菌性角膜炎中, 角膜持续、过度的炎症反应会加重真菌性角膜炎的进展, 它会招募过量的各种炎性细胞因子和免疫细胞, 导致角膜组织蛋白质沉淀, 降低角膜透明度, 严重时可导致角膜溃疡穿孔从而损害视功

能[30]。在我们的实验中,建立的小鼠烟曲霉菌性角膜炎模型也验证了这一点,在第3、5天的炎症评分中可见临床评分升高,于第3天拍摄的未经治疗的对照组小鼠角膜裂隙灯照片也显示了角膜溃疡面积和深度更大,角膜几乎不透明,且呈水肿状态,以上结果都提示我们若不控制过度的炎症反应会导致严重的角膜溃疡甚至穿孔。体内实验方面,在烟曲霉菌感染的人角膜上皮细胞引起的炎症反应中,IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、LOX-1的表达在基因层面呈升高趋势,同时我们还检测了IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 在蛋白水平的表达也呈升高趋势。因此在真菌性角膜炎的治疗中,抑制炎症反应中的免疫细胞过度激活,降低炎症因子的过度表达至关重要。不仅如此,目前在真菌性角膜炎的临床治疗中,缺乏强而有效的抗真菌药物,常规药物往往由于渗透性差、安全性低等因素使目前对于真菌性角膜炎的治疗较为棘手。

GA是化学结构最简单的天然多酚类化合物,具有抗氧化、抑菌、抗炎、抗肿瘤等多种生物活性。GA所具备的抗炎作用已在多种疾病模型中被证实。例如在特应性皮炎中,GA通过抑制NF- $\kappa$ B和p38MAPK的活化,减少炎症细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL-6的表达[31],从而能够有效缓解特应性皮炎红、肿、干、厚等症状;在溃疡性结肠炎模型中,有研究评估了GA对正常人肠上皮细胞(HIEC-6)和2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的溃疡性结肠炎小鼠模型的影响,结果表明,GA可提高IL-4、IL-10水平,降低IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA的表达,且GA能明显改善临床症状,减轻结肠炎症[21]。我们的研究结果也证实了这点,我们用烟曲霉菌感染的人角膜上皮细胞引起的炎症反应中检测IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、LOX-1的基因表达,发现GA均可下调上述炎症因子和模式识别受体的表达升高,同时在蛋白层面,GA也可下调IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的表达升高。以上结果表明在炎症反应过程中,GA可以抑制人角膜上皮中部分炎症因子的表达。同时,我们构建的烟曲霉菌性角膜炎小鼠模型,发现经GA治疗的小鼠相对于对照组小鼠角膜的溃疡面积和深度更小、透明度更高,穿孔率低,且第3、5天的临床评分均明显降低,表明GA在小鼠烟曲霉菌性角膜炎中可以减轻炎症反应,改善临床症状,发挥抗炎作用。因此,我们的研究表明GA在小鼠烟曲霉菌性角膜炎中可以减轻炎症反应,发挥治疗作用,后期我们将把GA作为一种有潜力的治疗真菌性角膜炎的药物,继续深入探讨其抗炎作用的具体机制。

## 参考文献

- [1] 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>
- [2] Li, C., Zhao, G.Q., Che, C.Y., Lin, J., Li, N., Jia, W.Y., *et al.* (2012) Effect of Corneal Graft Diameter on Therapeutic Penetrating Keratoplasty for Fungal Keratitis. *International Journal of Ophthalmology*, **5**, 698-703.
- [3] He, K., Yue, L.H., Zhao, G.Q., Li, C., Lin, J., Jiang, N., *et al.* (2016) The Role of LOX-1 on Innate Immunity against *Aspergillus Keratitis* in Mice. *International Journal of Ophthalmology*, **9**, 1245-1250.
- [4] Zhang, J., Zhao, G., Lin, J., Che, C., Li, C., Jiang, N., *et al.* (2016) Role of PTX3 in Corneal Epithelial Innate Immunity against *Aspergillus Fumigatus* Infection. *Experimental Eye Research*, **167**, 152-162. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.11.017>
- [5] Latgé, J.P. (1999) *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Review*, **12**, 310-350. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.2.310>
- [6] O'Day, D.M., Head, W.S., Robinson, R.D. and Clanton, J.A. (1986) Corneal Penetration of Topical Amphotericin B and Natamycin. *Current Eye Research*, **5**, 877-882. <https://doi.org/10.3109/02713688609029240>
- [7] Peng, X.D., Zhao, G.Q., Lin, J., Jiang, N., Xu, Q., Zhu, C.C., *et al.* (2015) Fungus Induces the Release of IL-8 in Human Corneal Epithelial Cells, via Dectin-1-Mediated Protein Kinase C Pathways. *International Journal of Ophthalmology*, **8**, 441-447.
- [8] Kawakami, H., Inuzuka, H., Hori, N., Takahashi, N., Ishida, K., Mochizuki, K., *et al.* (2015) Inhibitory Effects of Antimicrobial Agents against *Fusarium* Species. *Medical Mycology*, **53**, 603-611. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv016>
- [9] Yilmaz, S., Ozturk, I. and Maden, A. (2007) Microbial Keratitis in West Anatolia, Turkey: A Retrospective Review. *International Ophthalmology*, **27**, 261-268. <https://doi.org/10.1007/s10792-007-9069-2>



- [10] Khani, S., Seyedjavadi, S.S., Hosseini, H.M., Goudarzi, M., Valadbeigi, S., Khatami, S., *et al.* (2020) Effects of the Antifungal Peptide Skh-AMP1 Derived from *Satureja khuzistanica* on Cell Membrane Permeability, ROS Production, and Cell Morphology of Conidia and Hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Peptides*, **123**, Article ID: 170195. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170195>
- [11] Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D. and Zychlinsky, A. (2012) Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annual Review of Immunology*, **30**, 459-489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>
- [12] Lübnow, C., Bockstiegel, J. and Weindl, G. (2020) Lysosomotropic Drugs Enhance Pro-Inflammatory Responses to IL-1 $\beta$  in Macrophages by Inhibiting Internalization of the IL-1 Receptor. *Biochemical Pharmacology*, **175**, Article ID: 113864. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113864>
- [13] Yang, H., Wang, Q., Han, L., Yang, X., Zhao, W., Lyu, L., *et al.* (2020) Nerolidol Inhibits the LOX-1 / IL-1 $\beta$  Signaling to Protect against the *Aspergillus fumigatus* Keratitis Inflammation Damage to the Cornea. *International Immunopharmacology*, **80**, Article ID: 106118. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106118>
- [14] He, K., Yue, L.H., Zhao, G.Q., Li, C., Lin, J., Jiang, N., *et al.* (2016) The role of LOX-1 on Innate Immunity against *Aspergillus keratitis* in Mice. *International Journal of Ophthalmology*, **9**, 1245-1250.
- [15] Meresman, G.F., Götte, M. and Laschke, M.W. (2021) Plants as Source of New Therapies for Endometriosis: A Review of Preclinical and Clinical Studies. *Human Reproduction Update*, **27**, 367-392. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa039>
- [16] Cao, Y., Dai, B., Wang, Y., Huang, S., Xu, Y., Cao, Y., *et al.* (2008) *In Vitro* Activity of Baicalein against *Candida albicans* Biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **32**, 73-77. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.026>
- [17] Fu, Z., Lu, H., Zhu, Z., Yan, L., Jiang, Y. and Cao, Y. (2011) Combination of Baicalein and Amphotericin B Accelerates *Candida albicans* Apoptosis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **34**, 214-218. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.214>
- [18] Yang, K., Zhang, L., Liao, P., Xiao, Z., Zhang, F., Sindaye, D., *et al.* (2020) Impact of Gallic Acid on Gut Health: Focus on the Gut Microbiome, Immune Response, and Mechanisms of Action. *Frontiers in Immunology*, **11**, Article ID: 580208. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.580208>
- [19] Ng, T.B., He, J.S., Niu, S.M., Pi, Z.F., Shao, W., Liu, F., *et al.* (2004) A Gallic Acid Derivative and Polysaccharides with Antioxidative Activity from Rose (*Rosa rugosa*) Flowers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **56**, 537-545. <https://doi.org/10.1211/0022357022944>
- [20] You, B.R., Kim, S.Z., Kim, S.H. and Park, W.H. (2011) Gallic Acid-Induced Lung Cancer Cell Death Is Accompanied by ROS Increase and Glutathione Depletion. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **357**, 295-303. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0900-8>
- [21] Zhu, L., Gu, P.Q. and Shen, H. (2019) Gallic Acid Improved Inflammation via NF- $\kappa$ B Pathway in TNBS-Induced Ulcerative Colitis. *International Immunopharmacology*, **67**, 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.11.049>
- [22] Li, Z.-J., Liu, M., Dawuti, G., Dou, Q., Ma, Y., Liu, H.-G., *et al.* (2017) Antifungal Activity of Gallic Acid *in Vitro* and *in Vivo*. *Phytotherapy Research*, **31**, 1039-1045. <https://doi.org/10.1002/ptr.5823>
- [23] Yoon, C.-H., Chung, S.-J., Lee, S.-W., Park, Y.B., Lee, S.K. and Park, M.C. (2012) Gallic Acid, a Natural Polyphenolic Acid, Induces Apoptosis and Inhibits Proinflammatory Gene Expressions in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocytes. *Joint Bone Spine*, **80**, 274-279. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.08.010>
- [24] Wu, T.G., Wilhelmus, K.R. and Mitchell, B.M. (2003) Experimental Keratomycosis in a Mouse Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **44**, 210-216. <https://doi.org/10.1167/iovs.02-0446>
- [25] Peiser, L. and Gordon, S. (2001) The Function of Scavenger Receptors Expressed by Macrophages and Their Role in the Regulation of Inflammation. *Microbes and Infection*, **3**, 149-159. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01362-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01362-9)
- [26] Varela, M.L., Mogildea, M., Moreno, I. and Lopes, A. (2018) Acute Inflammation and Metabolism. *Inflammation*, **41**, 1115-1127. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0739-1>
- [27] Medzhitov, R. (2008) Origin and Physiological Roles of Inflammation. *Nature*, **454**, 428-435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- [28] Sun, X., Wei, Z., Li, Y., Wang, J., Hu, J., Yin, Y., *et al.* (2020) Renal Denervation Restrains the Inflammatory Response in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Basic Research in Cardiology*, **115**, Article No. 15. <https://doi.org/10.1007/s00395-020-0776-4>
- [29] Wong, C.H.Y., Heit, B. and Kubes, P. (2010) Molecular Regulators of Leucocyte Chemotaxis during Inflammation. *Cardiovascular Research*, **86**, 183-191. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq040>
- [30] Piccolo, P., Annunziata, P., Mithbaokar, P. and Brunetti-Pierri, N. (2014) SR-A and SREC-I Binding Peptides Increase

---

HDA<sub>d</sub>-Mediated Liver Transduction. *Gene Therapy*, **21**, 950-957. <https://doi.org/10.1038/gt.2014.71>

- [31] Domínguez, R., Zhang, L., Rocchetti, G., Lucini, L., Pateiro, M., Munekata, P.E.S., *et al.* (2020) Elderberry (*Sambucus nigra*, L.) as Potential Source of Antioxidants. Characterization, Optimization of Extraction Parameters and bioactive properties. *Food Chemistry*, **330**, Article ID: 127266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127266>