

黄芩素在烟曲霉菌性角膜炎中的抗炎作用

朱玉楠^{1,2}, 朱筱嘉^{1,2}, 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

Email: *doctorpxd@126.com

收稿日期: 2020年9月28日; 录用日期: 2020年10月13日; 发布日期: 2020年10月20日

摘要

黄芩素(Baicalein, BE)是从双子叶唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis*)的干燥根中提取分离出来的一种黄酮类天然小分子化合物。研究发现黄芩素在感染性疾病中具有抗真菌, 抗炎, 抗氧化, 调节机体免疫功能等作用。但在真菌性角膜炎中尚未有研究, 本文就黄芩素在烟曲霉菌性小鼠角膜炎模型中的作用进行研究。方法: 体外实验用烟曲霉菌感染HCECs后, 再用黄芩素处理, PCR和ELISA评估IL-1 β , TNF- α , IL-6的mRNA及蛋白的表达。体内实验用烟曲霉菌感染C57BL/6小鼠角膜制造烟曲霉菌角膜炎模型, 再用黄芩素或DMSO处理, PCR和ELISA评估IL-1 β , TNF- α , IL-6的mRNA及蛋白的表达。结果: 黄芩素通过降低IL-1 β , TNF- α , IL-6 mRNA及蛋白减轻角膜炎的炎症反应。结论: 黄芩素通过抑制促炎因子表达减轻小鼠角膜炎炎症反应。

关键词

黄芩素, 烟曲霉菌性角膜炎, 抗炎

Anti-Inflammatory Effect of Baicalein in *Aspergillus Fumigatus* Keratitis

Yunan Zhu^{1,2}, Xiaojia Zhu^{1,2}, Xudong Peng^{2*}

¹Qingdao University, Qingdao Shandong

²The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Email: *doctorpxd@126.com

Received: Sep. 28th, 2020; accepted: Oct. 13th, 2020; published: Oct. 20th, 2020

*通讯作者。

文章引用: 朱玉楠, 朱筱嘉, 彭旭东. 黄芩素在烟曲霉菌性角膜炎中的抗炎作用[J]. 临床医学进展, 2020, 10(10): 2260-2269. DOI: 10.12677/acm.2020.1010342

Abstract

Baicalein (BE) is a natural small molecular compound of flavonoids extracted from the dried roots of *Scutellaria baicalensis*, a plant in the family of dicotyledons and labiatae. Studies have found that BE has anti-fungal, anti-inflammatory, anti-oxidant, and immune function regulation effects in infectious diseases. But it has not been studied in fungal keratitis. This article studies the role of BE in the mouse model of *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) keratitis. Methods: *In vitro* experiments. After HCECs were infected with *A. fumigatus*, they were treated with BE, PCR and ELISA were used to evaluate the mRNA and protein expression of IL-1 β , TNF- α , and IL-6. *In vivo* experiments, the cornea of C57BL/6 mice was infected with *A. fumigatus* hyphae to create an *A. fumigatus* keratitis model, and then it was treated with BE or DMSO. PCR and ELISA evaluated the mRNA and protein expression of IL-1 β , TNF- α , IL-6. Results: BE reduced the inflammatory response of keratitis by reducing IL-1 β , TNF- α , IL-6mRNA and protein. Conclusion: BE reduces the inflammatory response of mouse keratitis by inhibiting the expression of pro-inflammatory factors.

Keywords

Baicalein, *Aspergillus fumigatus* Keratitis, Anti-Inflammatory

Copyright © 2020 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

真菌性角膜炎是一种由真菌病原体入侵角膜导致的严重的化脓性角膜感染，通常是溃疡性角膜感染，如果治疗不当，可能导致角膜破坏和严重失明的眼内炎。最常见的病原体是丝状真菌如镰刀菌和烟曲霉菌。普遍存在于发展中国家农业地区，常发生于角膜外伤史，佩戴隐形眼镜，慢性眼表疾病，局部或全身长期使用抗生素或类固醇[1] [2] [3] [4]。真菌性角膜炎的药物治疗失败是很常见的，目前可用的抗真菌药物存在多种缺点，如眼部渗透性差，生物利用度不可预测，以及全身用药相关的不良反应。因此需要更有效的局部抗真菌治疗。为了增加抗真菌滴眼液的使用量，重要的是要研究其他种类的局部使用的抗真菌药物的使用情况[5] [6]。

免疫调节在真菌性角膜炎(FK)的发病机制中起重要作用。白细胞介素作为重要的促炎细胞因子，参与角膜真菌感染的免疫防御过程。IL-6 在角膜的感染和炎症过程中起着至关重要的作用，IL-6 是真菌性角膜炎潜在治疗靶标，真菌感染通过 IL-6 介导的跨细胞信号传导促进巨噬细胞和 T 细胞活化调节免疫细胞迁移和诱导趋化因子分泌[7] [8] [9]。在真菌性角膜炎中，眼表的粘膜上皮细胞和免疫细胞分泌 IL-1 β 。信号通路 Dectin-1/syk, TLR4, LOX-1 等参与真菌性角膜炎中 IL-1 β 的产生[10] [11] [12] [13] [14]。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)是一种多功能细胞因子，在炎症、感染中是重要免疫功能的中枢生物介质。已有多项研究发现真菌性角膜炎中 IL-1 β , TNF- α , IL-6 表达升高，而抑制 IL-1 β , TNF- α , IL-6 的表达会减轻真菌性角膜炎的炎症反应[15] [16] [17]。

黄芩素是存在于黄芩干燥根中的一种酚类黄酮。黄芩素具有明显抗炎的作用，现在已经应用于感染、肝病、心脑血管疾病、神经退行性疾病等疾病中[18]。在脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞中，黄芩素通过

ER 依赖途径抑制诱导型一氧化氮合酶、环氧合酶-2 和肿瘤坏死因子- α 基因的表达, 抑制一氧化氮的产生, 以及炎性细胞因子(IL- 1β 、前列腺素 E2 和肿瘤坏死因子- α)的产生, 从而发挥抗炎作用[19]。黄芩素通过减弱血清和肝脏 IL-6、IL- 1β 和 TNF- α 的升高, 对扑热息痛所致小鼠急性肝损伤起保护作用[20]。黄芩素通过阻断 Toll 样受体 4 的表达, 抑制髓过氧化物酶活性及肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素- 1β 水平, 在 LPS 诱导的乳腺炎小鼠中减轻炎症反应[21]。而尚未发现黄芩素在真菌性角膜炎中的应用研究。本文主要研究黄芩素在真菌性小鼠角膜炎中的抗炎作用。

2. 实验材料

2.1. 实验物品

2.1.1. 实验对象

8 周龄 SPF 级 C57BL/6 雌鼠, 体重 19~23 g, 购自济南鹏跃实验动物有限公司(中国济南)。所有 C57BL/6 小鼠根据 ARVO 关于在眼科动物中使用动物眼科及视觉的声明, 这项研究遵循了赫尔辛基宣言的宗旨。

2.1.2. 实验烟曲霉菌

中国普通微生物文化采集中心(中国北京)提供烟曲霉菌株(NO3.0772)。

2.1.3. 实验细胞

RAW264.7 从中国科学院上海获得。

2.2. 实验主要相关耗材

2.2.1. 真菌培养所需耗材及试剂

Sabouroud 培养基 北京 Solarbio 公司; 无水乙醇 南京宏益化学试剂有限公司; 磷酸盐缓冲液(PBS) 北京 Solarbio 公司。

2.2.2. 制备动物模型相关耗材与试剂

封口膜 美国 National Can 公司; 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; 外科 5-0 黑丝线, 上海浦东金环医疗用品股份有限公司; 75%酒精, 南京宏益化学试剂有限公司; 眼科显微器械, 美国 Fisher Scientific 公司。

2.2.3. 小鼠角膜局部处理及 RAW 细胞处理所需试剂

黄芩素(BE) MCE 公司; 二甲基亚砜(DMSO) 北京 Solarbio 公司。
磷酸盐缓冲液(PBS)北京 Solarbio 公司。

2.2.4. Real-time PCR 相关试剂及耗材

RNAiso Plus 大连宝生物工程有限公司; EP 管 美国 Corning 公司; 氯仿 南京宏益化学试剂有限公司; 异丙醇 南京宏益化学试剂有限公司; 无水乙醇 南京宏益化学试剂有限公司; 八联排 美国 Axygen 公司; DEPC 水 上海生物工程有限公司; RNAisoPlus 中国大连 TaKaRa; SYBR PremixExTaq 中国大连 TaKaRa; Prime Script RT reagent kit with g DNA Eraser 中国大连 TaKaRa。

2.2.5. Elisa 相关试剂及耗材

小鼠的 IL- 1β 酶联免疫吸附测定试剂盒 R & D Systems (SanDiego, CA, USA); 小鼠的 TNF- α 酶联免疫吸附测定试剂盒 R & D Systems (SanDiego, CA, USA); 小鼠的 IL-6 酶联免疫吸附测定试剂盒 R & D Systems (SanDiego, CA, USA)。

2.3. 实验方法

2.3.1. 烟曲霉菌培养与菌丝的制备

取冻存的烟曲霉菌标准菌株, 在超净台上, 将其接种于 Sabouroud 琼脂固体培养基, 置于 28℃ 的恒温箱内孵育 7 天。在显微镜下观察到菌株生长状态, 待其生长良好时, 用消毒后洁净的接种环刮取培养基来收集烟曲霉菌的孢子和菌丝, 接种于经过高压消毒后的 300 ml Sabouroud 液体培养基的无菌烧瓶内, 用纱布严密包扎盛有液体培养基的无菌烧瓶瓶口。放置 37℃ 的 120 rpm 摇床培养箱中培养 5 天。当烟曲霉菌菌丝生长至团块状菌丝形态时, 收集菌丝于无菌玻璃管中, 研磨棒研磨并制备均匀混悬液。将研磨后菌液置于离心机 4℃, 4500 rpm, 离心 10 分钟, 离心结束后弃上清, 并用无菌 PBS 洗涤菌丝沉淀 3 次后再次离心 10 分钟后弃上层培养液。一部分加入不含胎牛血清的 DMEM 混匀, 得到有活性的烟曲霉菌菌丝; 另一部分菌丝中加入 75% 的酒精混匀, 并置于 4℃ 冰箱过夜灭活菌丝。第二天将其离心后弃上层酒精, 再使用 PBS 洗涤菌丝沉淀 3 次, 再次离心, 弃去洗涤液, 然后细胞培养液得到灭活的菌丝悬液。细胞计数板并调整其终浓度为 1×10^7 CFU/ml。

2.3.2. 小鼠真菌性角膜炎模型的建立

采用 8% 水合氯醛腹腔内注射法对 C57BL/6 小鼠进行麻醉, 麻醉成功后, 将小鼠并固定于操作台。显微镜下, 用洁净刀片在小鼠角膜中央划伤上皮深达浅基质层, (约 2 mm 直径范围), 然取已制备好的浓度为 1×10^7 CFU/mL 的具有活性的烟曲霉菌菌丝 5 μ L 覆盖于角膜上皮缺损位置, 在菌丝表面放置上软性角膜接触镜, 最后用 5-0 缝合线缝合上下眼睑 1 针, 使其闭合。右眼为空白对照组。将小鼠随机分为两组, 分别为 BE 处理组, 和 DMSO 处理组。第一天拆线后每天三次给药处理, 给药方式为眼水点眼, 并于 1, 3 天拍照并对小鼠角膜进行炎症评分。炎症评分和分度, 评分标准参考 Wu [22]。

2.3.3. RAW 细胞处理

将培养在 6 孔板或 12 孔板的 RAW 细胞于温箱培养 24 小时后, 给予灭活烟曲霉菌菌丝刺激 1 小时后, 加入 BE 或 DMSO, 菌丝感染 8 小时后收集 12 孔板的细胞用于 PCR 实验, 用于检测 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达水平。菌丝感染 24 小时后收集 24 孔板的上清液用于 Elisa 实验用于检测 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 的蛋白表达水平。

2.3.4. Real-time RT-PCR 实验方法

1. Total RNA 的提取

- (1) 将含有角膜或者细胞的 RNA 裂解液的 EP 管置于冰盒上, 使其充分裂解 30 分钟。
- (2) 将 EP 管于 4℃, 12000 rpm, 离心 5 分钟后取上清并置于另一洁净 EP 管中。
- (3) 加入与 RNA 裂解液 1/5 体积量相等的三氯甲烷, 并上下颠倒震荡 EP 管 15 秒使其彻底混匀。室温放置 5 分钟后再置于 4℃, 12000 rpm, 离心 15 分钟。
- (4) 离心后小心取出 EP 管, 小心地吸取最上层的液体转移至另一洁净 EP 管中, 注意不要碰到蛋白层以及最下层液体。
- (5) 向含有最上层液体的 EP 管中加入等体积的异丙醇, 并将 EP 管上下颠倒震荡混匀 15 秒, 并置于室温下 10 分钟。
- (6) 置于离心机, 4℃, 12,000 rpm, 离心 10 分钟后弃上清液, 此时乳白色的 RNA 沉淀于 EP 管管底, 弃掉上清液。
- (7) 加入 75% 酒精(使用 DEPC 水配制), 并上下颠倒 15 秒。置于 4℃, 12,000 rpm, 离心 5 分钟后小心弃掉酒精。

(8) 室温下干燥 EP 管沉淀约 20 分钟后, 加入适量 DEPC 水 10~15 μ l, 吹打、震荡使其彻底溶解后, 立即测定 RNA 含量以及纯度。

2. Total RNA 含量及浓度测定

使用核酸浓度分析设备测定 260 nm、280 nm 处吸光度(optical density, OD 值)以及两者比值, 根据所测样本 RNA 浓度建立 2 μ g RNA 体系, 计算所需 RNA 体积。

3. PCR

配置相应混合待测液, 立即置 PCR 仪上, 进行内参及目的基因扩增反应。扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s、60 $^{\circ}$ C 30 s (重复 40 个循环) \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 退火、延伸 15 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 溶解 15 s。反应结束后, 根据各样本的内参及目的基因循环数, 计算目的分子的 mRNA 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
<i>β-Actin (mouse)</i>	F	5'-GAT TAC TGC TCT GGC TCC TAG C-3'	NM_007393.3
	R	5'-GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG C-3'	
<i>IL-1β (mouse)</i>	F	5'-CGC AGC AGC ACA TCA ACA AGA GC-3'	NM_008361.4
	R	5'-TGT CCT CAT CCT GGA AGG TCC ACG-3'	
<i>TNF-α (mouse)</i>	F	5'-ACC CTC ACA CTC AGA TCA TCT T-3'	NM_013693.3
	R	5'-GGT TGT CTT TGA GAT CCA TGC-3'	
<i>IL-6 (mouse)</i>	F	5'-TGATGGATGCTACCAAAGTGG-3'	NM_001314054.1
	R	5'-TGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG-3'	

F, forward; R, reverse.

2.3.5. ELISA

按照蛋白酶抑制剂: PBS 缓冲液为 495:5 配制小鼠角膜保存液。每组 6 个角膜。研磨器进一步磨碎角膜组织, 然后离心后取上清。24 孔板的上清液于 1500 g 离心取上清液。

按照 ELISA 试剂盒的说明书进行实验:

- (1) 96 孔板中加入 Capture Antibody 室温下孵育一整夜。
- (2) 弃去液体, 加入 Wash Buffer, 浸泡 1~2 分钟, 拍干, 重复洗板 3 次。
- (3) 加入 Reagent Diluent 在室温下孵育 1 小时。
- (4) 重复(2)步骤洗涤。
- (5) 加入标准品工作液以及样本, 室温孵育 2 小时。
- (6) 重复(2)步骤洗涤。
- (7) 加入 Detection Antibody 在室温下孵育 2 小时。
- (8) 重复(2)步骤洗涤。
- (9) 加入 Streptavidin-HRP 在室温避光下孵育 20 分钟。
- (10) 重复(2)步骤洗涤。
- (11) 加入 Substrate Solution 在室温避光下孵育 20 分钟。
- (12) 加入 Stop Solution 立即用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度(OD)值。
- (13) 根据 OD 值, 计算样品浓度。

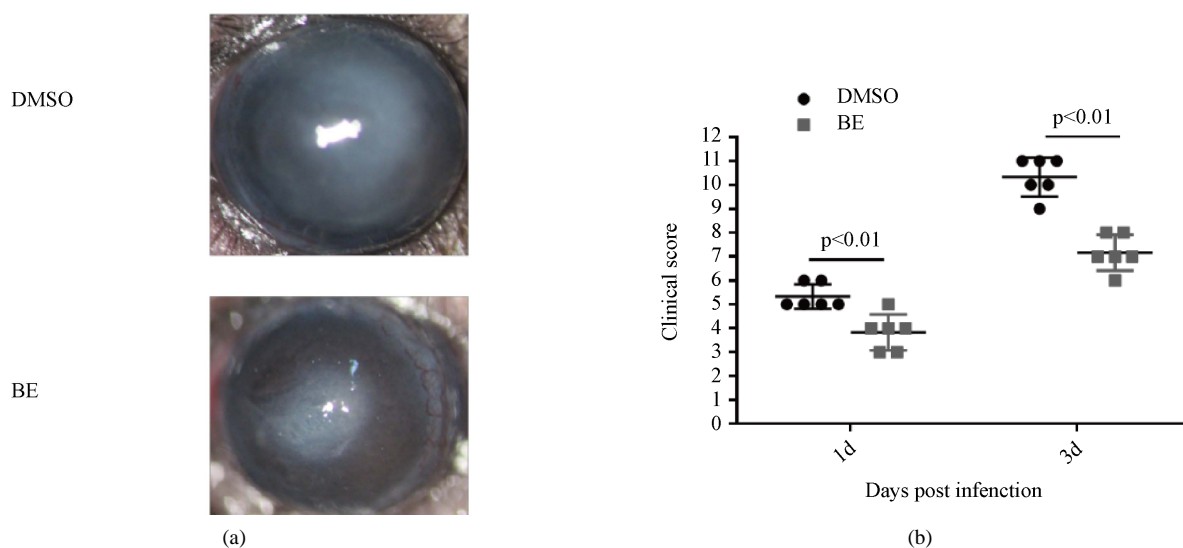
2.4. 统计学方法

每项实验均独立重复至少三次, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对各组实验进行统计学分析, 采用单因素方差分析(ANOVA)对三组或三组以上的数据进行比较, 并采用未配对双尾 t 检验对多组数据进行比较。 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 黄芩素处理后小鼠烟曲霉菌角膜炎临床评分

在烟曲霉菌角膜炎小鼠第三天, DMSO 处理组小鼠角膜溃疡面积大, 角膜水肿, 表面粗糙欠光滑, 虹膜纹理不清, 少数病例还可引起角膜穿孔。而黄芩素处理组小鼠角膜溃疡面积减小, 角膜尚透明, 无水肿(图 1(a))。DMSO 处理组烟曲霉菌性角膜炎模型与黄芩素处理组烟曲霉菌性角膜炎模型的临床评分相比, 黄芩素处理组临床评分明显低于 DMSO 处理组, 差异有统计学意义(图 1(b))。



注: (a) 烟曲霉菌感染小鼠角膜三天后黄芩素处理组与 DMSO 处理组临床表现在裂隙灯下拍照; (b) 烟曲霉菌感染小鼠角膜一, 三天后黄芩素处理组与 DMSO 处理组临床评分比较($n = 6$ 组)。

Figure 1. The clinical manifestations and clinical scores of BE in the treatment of *A. fumigatus* keratitis in mice
图 1. 黄芩素治疗小鼠烟曲霉菌角膜炎的临床表现及临床评分

3.2. 黄芩素降低小鼠烟曲霉菌角膜炎促炎因子 mRNA 的产生

检测小鼠烟曲霉菌角膜炎模型第三天, 角膜中促炎因子 mRNA 的变化。PCR 结果显示, 黄芩素处理组与对照组相比, 明显降低了 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达。差别具有统计学意义(图 2(a)~(c))。

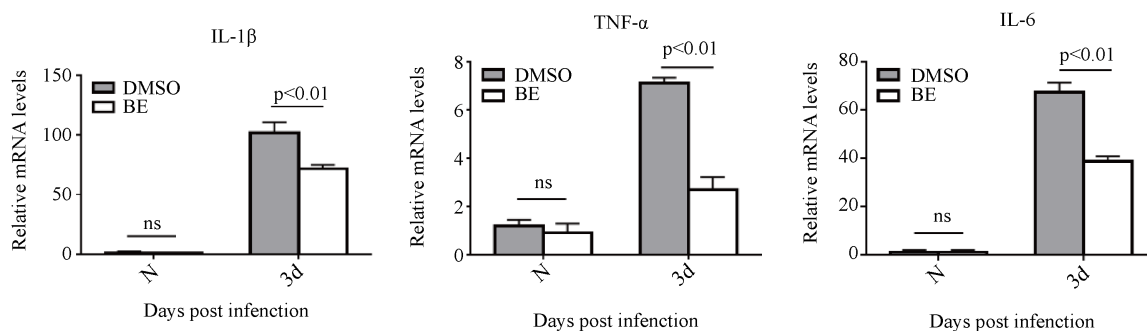
3.3. 黄芩素降低小鼠烟曲霉菌角膜炎促炎因子蛋白的产生

检测小鼠烟曲霉菌角膜炎模型第三天, 角膜中促炎因子蛋白的变化。Elisa 结果显示黄芩素处理组与对照组相比, 明显降低了 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 的蛋白表达。具有统计学意义(图 3(a)~(c))。

3.4. 黄芩素处理后, RAW 中促炎因子的 mRNA 变化

灭活烟曲霉菌处理 RAW1 小时后, 用黄芩素或 DMSO 处理 7 小时, 检测 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达。PCR 结果显示, 单纯烟曲霉菌处理组 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达升高, 烟曲霉菌

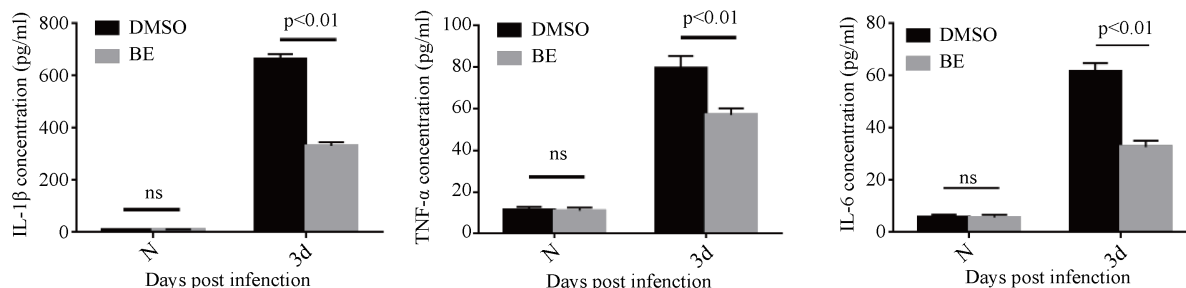
+ DMSO 组与单纯烟曲霉菌处理组相比, 炎症因子无任何变化, 排除 DMSO 对实验造成的影响, 烟曲霉菌 + 黄芩素组与单纯烟曲霉菌处理组相比, 降低 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达(图 4(a)~(c))。



注: (a)~(c) 烟曲霉菌感染小鼠角膜第三天, 与 DMSO 处理相比, 黄芩素组角膜中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6mRNA 表达降低(n = 6 组)。

Figure 2. The mRNA expression of pro-inflammatory factors in the BE treatment group and DMSO treatment group on the third day of the cornea of mice infected by *A. fumigatus*

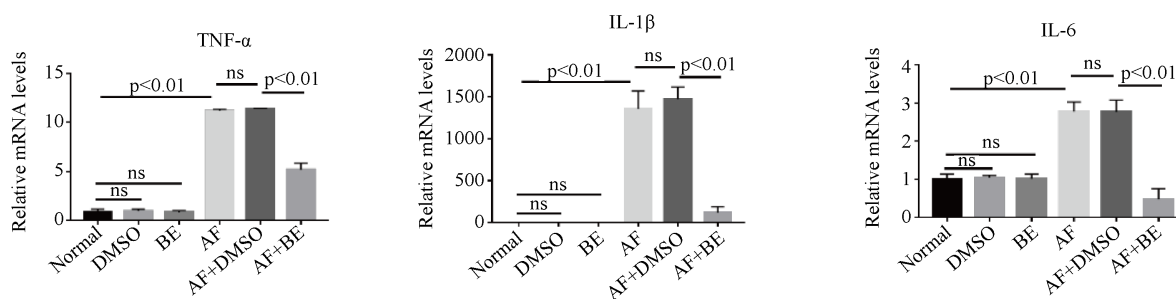
图 2. 烟曲霉菌感染小鼠角膜第三天黄芩素处理组与 DMSO 处理组促炎因子 mRNA 表达



注: (a)~(c) 烟曲霉菌感染小鼠角膜第三天, 与 DMSO 处理相比, 黄芩素组角膜中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 蛋白表达降低(n = 6 组)。

Figure 3. The expression of pro-inflammatory factor proteins in the BE treatment group and DMSO treatment group on the third day of the cornea of mice infected by *A. fumigatus*

图 3. 烟曲霉菌感染小鼠角膜第三天黄芩素处理组与 DMSO 处理组促炎因子蛋白表达



注: (a)~(c) 烟曲霉菌刺激 RAW 细胞, 用黄芩素或 DMSO 处理, 与 DMSO 处理相比, 黄芩素组角膜中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6mRNA 表达降低(n = 6 组)。

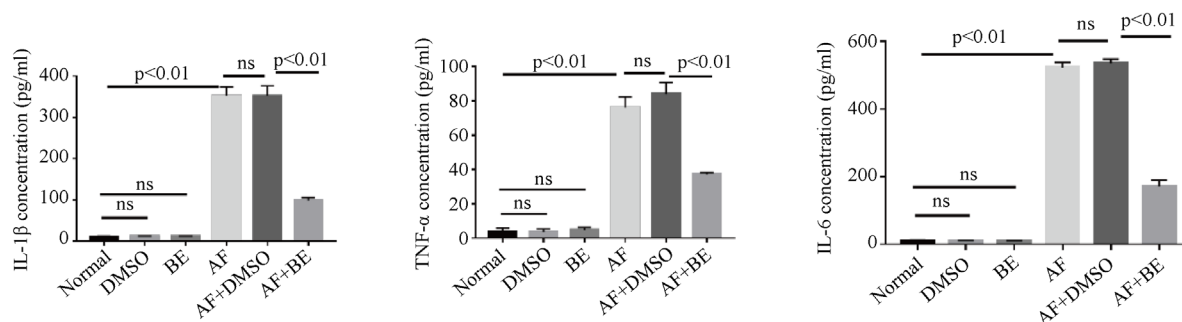
Figure 4. RAW cells stimulated by *A. fumigatus*, the expression of pro-inflammatory factors mRNA in the BE treatment group and DMSO treatment group.

图 4. 烟曲霉菌刺激 RAW 细胞, 黄芩素处理组与 DMSO 处理组促炎因子 mRNA 表达

3.5. 黄芩素处理后, RAW 中促炎因子的蛋白变化

灭活烟曲霉菌处理 RAW1 小时后, 用黄芩素或 DMSO 处理 23 小时, 检测 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 的

蛋白表达。Elisa 结果显示,单纯烟曲霉菌处理组 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 的蛋白表达升高,与对照组 DMSO 组相比,黄芩素组 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 的蛋白表达下降。说明黄芩素通过抑制炎症因子的表达减轻炎症反应(图 5(a)~(c))。



注: (a)~(c) 烟曲霉菌刺激 RAW 细胞,用黄芩素或 DMSO 处理,与 DMSO 处理相比,黄芩素组角膜中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 蛋白表达降低(n=6 组)。

Figure 5. RAW cells stimulated by *A. fumigatus*, the expression of pro-inflammatory factor proteins in the BE treatment group and DMSO treatment group

图 5. 烟曲霉菌刺激 RAW 细胞,黄芩素处理组与 DMSO 处理组促炎因子蛋白表达

4. 讨论

真菌性角膜炎是一种严重的溃疡性化脓性疾病,患者主要是发展中国家的农民,因其治疗手段有限,有效药物匮乏,角膜供体缺乏,导致致盲率很高,并有失明风险。引起角膜炎的常见致病真菌是曲霉,镰刀菌,念珠菌,弯孢菌和青霉菌,其中镰刀菌和曲霉菌是主要的[23] [24],真菌感染角膜时,首先触发先天性免疫,激活的先天免疫随后会导致有效的适应性免疫[25]。在真菌和宿主之间接触后,真菌可以被宿主上皮细胞和免疫细胞表达的模式识别受体(PRR)识别。PPR 包括 Toll 样受体(TLR,包括 TLR2 和 TLR4),C 型凝集素受体(CLR, Dectin-1, Dectin-2 和 Mincle)和 NOD 样受体(NLR)并不直接有助于真菌识别。在烟曲霉性角膜炎期间,识别受体的表达增加可导致下游 IL-1 β , TNF- α , IL-6 升高,明显高于非角膜炎对照组。IL-1 β , IL-6 被认为是反映炎症严重程度的标志物,然而过度表达炎症成分可能会对宿主产生破坏性影响,造成导致角膜细胞和组织成分的破坏引起角膜透明度降低,角膜水肿,混浊溃疡面积增加。而抑制过度炎症反应可能会改善真菌性角膜炎患者的预后[26] [27]。

黄芩素是一种广泛存在于植物中的黄酮类化合物,具有明显的抗炎,抗氧化、抗病毒、抗菌等多种药理活性。其中抗氧化和抗炎作用已在各种疾病模型中得到证实,包括糖尿病、心血管疾病、炎症性肠道疾病、痛风和类风湿性关节炎、哮喘、神经退行性疾病、肝脏和肾脏疾病、脑脊髓炎等。并且黄芩素对人体正常的细胞几乎没有毒性[28]。有报道黄芩素通过抑制巨噬细胞 MAPK 和 NF κ B 信号转导通路的激活,抑制炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和肿瘤坏死因子 α 的分泌,抑制铜绿假单胞菌感染引起的炎症反应[29];通过抑制巨噬细胞中的 IL-6、IL-8 和肿瘤坏死因子- α 的产生,发挥抗 H5N1 病毒的作用[30];通过减少心肌组织损伤,减少中性粒细胞浸润,减少促炎细胞因子 TNF- α , IL-1 β 的产生,缓解心肌缺血/再灌注(I/R)损伤[31]。

在本实验结果中可以看到,在烟曲霉菌小鼠角膜炎角膜中检测到 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 分泌增高,而黄芩素处理组会抑制 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 炎症因子 mRNA 及蛋白的表达。同样,在烟曲霉菌感染的巨噬细胞中会检测到上述促炎因子的表达增加,而这些促炎因子在黄芩素处理后却表达下调,另外黄芩素处理过小鼠角膜较对照组更加透明,溃疡面积减小,虹膜纹理清楚。所以这些结果提示黄芩素具有减轻烟

曲霉菌小鼠角膜炎炎症反应的作用。可为以后作为真菌性角膜炎代替药物，或者联合用药奠定基础。

参考文献

- [1] Bourcier, T., *et al.* (2017) Fungal Keratitis. *Journal francais d'ophtalmologie*, **40**, e307-e313. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2017.08.001>
- [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] Mahmoudi, S., *et al.* (2018) Fungal Keratitis: An Overview of Clinical and Laboratory Aspects. *Mycoses*, **61**, 916-930. <https://doi.org/10.1111/myc.12822>
- [4] Kredics, L., *et al.* (2015) Filamentous Fungal Infections of the Cornea: A Global Overview of Epidemiology and Drug Sensitivity. *Mycoses*, **58**, 243-260. <https://doi.org/10.1111/myc.12306>
- [5] Sahay, P., *et al.* (2019) Pharmacologic Therapy of Mycotic Keratitis. *Survey of Ophthalmology*, **64**, 380-400. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2019.02.007>
- [6] Neoh, C., *et al.* (2014) Clinical Utility of Caspofungin Eye Drops in Fungal Keratitis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **44**, 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.04.008>
- [7] Peng, L., *et al.* (2020) Therapeutic Effects of An Anti-IL-6 Antibody in Fungal Keratitis: Macrophage Inhibition and T Cell Subset Regulation. *International Immunopharmacology*, **85**, Article ID: 106649. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106649>
- [8] Zhao, G., *et al.* (2017) The Role of Mincle in Innate Immune to Fungal Keratitis. *Journal of Infection in Developing Countries*, **11**, 89-97. <https://doi.org/10.3855/jidc.7570>
- [9] Carnt, N., *et al.* (2012) Association of Single Nucleotide Polymorphisms of Interleukins-1 β , -6, and -12B with Contact Lens Keratitis Susceptibility and Severity. *Ophthalmology*, **119**, 1320-1327. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.01.031>
- [10] Gao, X., *et al.* (2016) LOX-1 and TLR4 Affect Each Other and Regulate the Generation of ROS in *A. fumigatus* Keratitis. *International Immunopharmacology*, **40**, 392-399. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.09.027>
- [11] Yang, H., *et al.* (2020) Nerolidol Inhibits the LOX-1/IL-1 β 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>
- [12] Yuan, K., *et al.* (2017) Dectin-1 Is Essential for IL-1 β Production through JNK Activation and Apoptosis in *Aspergillus fumigatus* Keratitis. *International Immunopharmacology*, **52**, 168-175. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.09.008>
- [13] Zhu, K., Mu, H. and Pi, B. (2016) Regulatory Effect of Caspase-11 on Interleukin-1 β in the Fungal Keratitis. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, **29**, 2327-2334.
- [14] Che, C., *et al.* (2018) Wnt5a Contributes to Dectin-1 and LOX-1 Induced Host Inflammatory Response Signature in *Aspergillus fumigatus* Keratitis. *Cellular Signalling*, **52**, 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.08.020>
- [15] Sun, Q., *et al.* (2019) Celastrol Ameliorates *Aspergillus fumigatus* Keratitis via Inhibiting LOX-1. *International Immunopharmacology*, **70**, 101-109. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.02.017>
- [16] Zhan, L., *et al.* (2020) Honokiol Reduces Fungal Load, Toll-Like Receptor-2, and Inflammatory Cytokines in *Aspergillus fumigatus* Keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **61**, 48. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.4.48>
- [17] Zhou, Y., *et al.* (2019) The Role of Netrin-1 in the Mouse Cornea during *Aspergillus fumigatus* Infection. *International Immunopharmacology*, **71**, 372-381. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.03.047>
- [18] Shen, J., *et al.* (2020) Traditional Uses, Clinical Studies, and Ten-Years Research Progress in Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Scutellaria*. *Journal of Ethnopharmacology*, **265**, Article ID: 113198. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113198>
- [19] Fan, G., *et al.* (2013) Anti-Inflammatory Activity of Baicalein in LPS-Stimulated RAW264.7 Macrophages via Estrogen Receptor and NF- κ B-Dependent Pathways. *Inflammation*, **36**, 1584-1591. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9703-2>
- [20] Zhou, H., *et al.* (2018) Hepatoprotective Effect of Baicalein against Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury in Mice. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **24**, 131. <https://doi.org/10.3390/molecules24010131>
- [21] He, X., *et al.* (2015) Baicalein Attenuates Inflammatory Responses by Suppressing TLR4 Mediated NF- κ B and MAPK Signaling Pathways in LPS-Induced Mastitis in Mice. *International Immunopharmacology*, **28**, 470-476. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.07.012>
- [22] Wu, T., Wilhelmus, K. and Mitchell, B. (2003) Experimental Keratomycosis in a Mouse Model. *Investigative Oph-*

-
- thalmology & Visual Science*, **44**, 210-216. <https://doi.org/10.1167/iovs.02-0446>
- [23] Wang, L., *et al.* (2015) Study of Pathogens of Fungal Keratitis and the Sensitivity of Pathogenic Fungi to Therapeutic Agents with the Disk Diffusion Method. *Current Eye Research*, **40**, 1095-1101. <https://doi.org/10.3109/02713683.2015.1056802>
- [24] He, D., *et al.* (2016) Etiological Analysis of Fungal Keratitis and Rapid Identification of Predominant Fungal Pathogens. *Mycopathologia*, **181**, 75-82. <https://doi.org/10.1007/s11046-015-9950-x>
- [25] Chen, P. and Xie, L. (2012) Signal Transduction Pathways Mediated by Toll-Like Receptors and Their Relations with Fungal Keratitis. *Chinese Journal of Ophthalmology*, **48**, 80-84.
- [26] Zhong, J., *et al.* (2016) Inhibition of TREM-1 and Dectin-1 Alleviates the Severity of Fungal Keratitis by Modulating Innate Immune Responses. *PLoS ONE*, **11**, e0150114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150114>
- [27] Key, L., *et al.* (2011) Clinical and Microbiological Characteristics of Fungal Keratitis in the United States, 2001-2007: A Multicenter Study. *Ophthalmology*, **118**, 920-926. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2010.09.011>
- [28] Dinda, B., *et al.* (2017) Therapeutic Potentials of Baicalin and Its Aglycone, Baicalein against Inflammatory Disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **131**, 68-80. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.004>
- [29] Luo, J., *et al.* (2016) Baicalein Attenuates the Quorum Sensing-Controlled Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* and Relieves the Inflammatory Response in *P. aeruginosa*-Infected Macrophages by Downregulating the MAPK and NFκB Signal-Transduction Pathways. *Drug Design, Development and Therapy*, **10**, 183-203. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S97221>
- [30] Sithisarn, P., *et al.* (2013) Differential Antiviral and Anti-Inflammatory Mechanisms of the Flavonoids Biochanin A and Baicalein in H5N1 Influenza A Virus-Infected Cells. *Antiviral Research*, **9**, 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.10.004>
- [31] D'amico, R., *et al.* (2019) Effects of a New Compound Containing Palmitoylethanolamide and Baicalein in Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury *in Vivo*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, **54**, 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.191>