

丁香酚治疗小鼠真菌性角膜炎的作用机制研究

于冰, 李翠*

青岛大学附属医院眼科, 山东 青岛

收稿日期: 2022年1月14日; 录用日期: 2022年2月8日; 发布日期: 2022年2月16日

摘要

目的: 探讨丁香酚(Eugenol, EUG)在烟曲霉菌性角膜炎中的抗炎、抗氧化作用。方法: 提取C57BL/6小鼠的腹腔巨噬细胞, 给予丁香酚或DMSO溶液预处理后, 使用灭活的烟曲霉菌菌丝刺激细胞。烟曲霉菌感染小鼠角膜, 给予丁香酚或DMSO点眼处理五天。采用实时荧光定量PCR测定巨噬细胞及小鼠角膜中炎症因子(IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、iNOS)以及模式识别受体TLR2的mRNA表达水平。使用裂隙灯观察小鼠角膜病变情况, 角膜HE染色评估炎症细胞浸润程度。采用DCFH-DA荧光探针检测巨噬细胞中活性氧的水平。结果: 在小鼠腹腔原代巨噬细胞中, 丁香酚预处理显著抑制了烟曲霉菌刺激引起的炎症因子及TLR2的表达升高, 同时降低了细胞中活性氧水平。与DMSO对照组相比, 经丁香酚处理的真菌性角膜炎小鼠的角膜更加透明、水肿减轻、溃疡面积较对照组明显减小, 角膜组织中的炎症细胞浸润明显减轻。结论: 丁香酚可以通过抑制炎症因子及模式识别受体TLR2的表达、减少活性氧的产生, 在烟曲霉菌性角膜炎中发挥抗炎、抗氧化的作用。

关键词

丁香酚, 烟曲霉菌, 抗炎, 抗氧化

Study on the Therapeutic Mechanism of Eugenol in Mouse Fungal Keratitis

Bing Yu, Cui Li*

Department of Ophthalmology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Jan. 14th, 2022; accepted: Feb. 8th, 2022; published: Feb. 16th, 2022

Abstract

Objective: To investigate the anti-inflammatory and antioxidant effects of eugenol (EUG) on *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) keratitis. **Methods:** The macrophages were collected from the ab-

*通讯作者 Email: yankelicui@126.com

dominal cavity of C57BL/6 mice. After being pretreated with EUG or DMSO, the macrophages were stimulated by inactivated *A. fumigatus* mycelium. Mice corneas were infected with *A. fumigatus*, and then treated with EUG or DMSO spotting on the eyes for five days. Real-time PCR was performed to examine the mRNA expressions of inflammatory mediators (IL-1 β , TNF- α , IL-10 and iNOS) and Toll-like receptor 2 (TLR2). The severity of keratitis was observed under a slit-lamp. HE staining was applied to evaluate the effects of EUG on inflammatory cells infiltration. DCFH-DA fluorescent probe was used to detect the expression of reactive oxygen species in macrophages. Results: EUG significantly inhibited the expressions of inflammatory factors and TLR2 stimulated by *A. fumigatus*, and decreased the level of reactive oxygen species in macrophages. Compared with the DMSO treatment, mice corneas treated by EUG showed increased transparency, smaller ulcers and descended edema. Corneal HE staining showed that EUG significantly reduced the infiltration of inflammatory cells in corneal tissue. Conclusion: EUG plays an anti-inflammatory and antioxidant role in *A. fumigatus* keratitis by inhibiting the expressions of inflammatory factors and TLR2, as well as reducing the production of reactive oxygen species.

Keywords

Eugenol, *A. fumigatus*, Anti-Inflammatory, Antioxidant

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

真菌性角膜炎是一种常见的感染性眼病,其病因因地理位置、社会经济和环境气候而异[1]。据报道,真菌性角膜炎的致病菌有100余种,其中以曲霉菌属和镰刀菌属最为常见[2]。与细菌性角膜炎相比,真菌性角膜炎的病程更长,预后较差,常遗留永久性视力损害,甚至眼球摘除。在亚洲地区,真菌性角膜炎约占传染性角膜炎的一半,是导致失明的主要原因之一。真菌性角膜炎的患者常有不同程度的视力下降、眼红、流泪、疼痛和分泌物产生,严重影响患者的生活质量。随着植物性眼外伤的发生及隐形眼镜佩戴人数的增加[3],真菌性角膜炎的发病率持续增高。据统计,全球每年有大约一百万例新发感染[4],带来了沉重的社会经济负担。目前,局部使用抗真菌药物是真菌性角膜炎的一线治疗方式。

病原体侵入角膜组织后,角膜上皮细胞及巨噬细胞通过模式识别受体检测到病原体相关分子模式,激活局部的先天免疫反应,导致大量炎性因子、趋化因子产生及炎症细胞聚集。其中,活化的中性粒细胞通过产生活性氧、释放各种酶来杀灭病原体[5]。然而,过度的炎症反应及氧化应激在杀灭真菌的同时,对角膜组织产生了严重的破坏,是引起永久性视力损害的重要原因[6]。因此,单纯的抗真菌治疗无法取得满意的治疗效果。

丁香酚(4-烯丙基-2-甲氧基苯酚)是由丁香类植物中提取的一种苯丙烷类化合物,已被广泛用于口腔医学[7]、食品或化妆品的调味剂、防腐剂[8]。大量研究表明,丁香酚具有抗炎、抗氧化、抗微生物、麻醉、镇痛等药理作用[9][10][11][12]。有研究表明,在LPS诱导的小鼠急性肺损伤反应模型中,丁香酚通过抑制NF- κ B信号通路降低小鼠肺组织中IL-6、TNF- α 的表达,抑制中性粒细胞的聚集,并增加抗氧化剂(SOD1, CAT, Gpx1, GST)的表达[13]。此外,丁香酚还可以抑制LPS诱导的巨噬细胞中IL-1 β 、TNF- α 、

iNOS 的表达增高, 其抗炎作用可能与 NF- κ B、ERK1/2 及 P38MAPK 信号通路的抑制有关[14]。但是, 丁香酚是否能够在烟曲霉菌性角膜炎中发挥保护作用仍是未知的。本实验研究了丁香酚在烟曲霉菌感染的小鼠角膜和腹腔巨噬细胞中的抗炎、抗氧化作用, 旨在为真菌性角膜炎的治疗提供新的思路。

2. 材料与方法

2.1. 实验物品及试剂

2.1.1. 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠(雌性, 8 周龄)购买自北京斯贝福生物中心。实验动物的使用符合中国科学技术部实验动物的人道待遇指导要求及美国眼科和视觉研究协会(ARVO)关于动物的使用规定, 该实验已通过医院伦理委员会批准。

2.1.2. 实验细胞

按说明书制备硫代乙醇液体培养基, 高压蒸汽灭菌 15 分钟, 并在室温下冷却, 将冷却后的硫代乙醇培养基注入小鼠腹腔(1 ml/只), 充分按摩腹部。1 周后颈椎脱臼法处死小鼠, 使用一次性注射器向小鼠腹腔内注入 5 ml DMEM 培养液, 充分按摩腹腔后将腹腔内液体吸出。将吸出的液体离心 10 分钟(4 $^{\circ}$ C, 1200 rpm), 弃上清液, 离心管内加入适量含有 10% FBS 的培养液重悬细胞, 将细胞悬液转移至 12 孔细胞培养板中继续培养。

2.1.3. 实验菌种

烟曲霉菌菌株 3.0772 购买自中国国家微生物收藏中心。

2.1.4. 实验试剂

丁香酚(上海 MCE 公司)、RNAiso Plus (大连 TaKaRa 公司)、HiScript III RT (南京诺唯赞公司)、SYBR (南京诺唯赞公司)、DCFH-DA 荧光探针(上海 MCE 公司)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 烟曲霉菌的培养与制备

将烟曲霉菌孢子孵育于液体沙氏培养基中, 并置于恒温培养箱中, 37 $^{\circ}$ C 120 rpm, 培养至菌丝生成。收集菌丝, 使用预消毒的玻璃研磨棒将菌丝研磨至 20~40 μ m 长的细小片段, 4000 g 离心 30 分钟。离心后的菌丝浸泡于 75% 的乙醇中过夜灭活。次日, 使用无菌 PBS 充分洗涤菌丝, 离心(4000 g, 20 分钟), 弃上清液, 使用 DMEM 培养液调整菌丝浓度至 1×10^8 CFU/ML。

2.2.2. 灭活菌丝刺激腹腔巨噬细胞

12 孔板内的巨噬细胞分为 6 组: 正常组(N 组)、DMSO 对照组(DMSO 组)、丁香酚对照组(EUG 组)、加菌组(AF 组)、加菌加 DMSO 组(AF + DMSO 组)、加菌加丁香酚组(AF + EUG 组)。细胞贴壁后, 吸出培养液, 使用无菌 PBS 冲洗 3 遍, 随后向细胞培养板中加入含有 160 μ g/mL 丁香酚或 0.05% DMSO 的新鲜培养液预处理细胞 2 小时。随后各孔加入 50 μ l 灭活的烟曲霉菌菌丝, 置于恒温培养箱内孵育 8 小时(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)。

2.2.3. 烟曲霉菌性角膜炎小鼠模型的建立与处理

使用 8%水合氯醛对 C57BL/6 小鼠进行腹腔麻醉, 将麻醉后的小鼠置于无菌操作台上。在显微镜下使用无菌手术刀片刮除小鼠右眼角膜上皮, 半径约 2 mm, 在上皮缺损处做深达中部基质层的划痕, 并在角膜损伤处涂抹烟曲霉菌菌丝, 随后覆盖角膜接触镜并缝合眼睑。左眼不做处理。次日, 拆除眼睑缝线, 分别使用 160 μ g/mL 丁香酚或 0.05% DMSO 溶液对小鼠点眼处理, 每日 3 次。感染后第 1 天、第 5 天, 在眼科裂隙灯下观察小鼠角膜情况, 并拍照记录。小鼠角膜炎症分级标准见表 1。

Table 1. Inflammation grade of mouse fungal keratitis model**表 1.** 小鼠真菌性角膜炎模型炎症分级

	I 级(1 分)	II 级(2 分)	III 级(3 分)	IV 级(4 分)
溃疡面积	1%~25%	26%~50%	51%~75%	76%~100%
浑浊程度	虹膜纹理尚清 瞳孔可见、角膜轻度浑浊	虹膜可见 角膜较混浊	虹膜不见 角膜不均匀混浊	角膜均匀混浊
溃疡形态	轻度不规则	轻度水肿不规则	重度水肿、龛样溃疡 或后弹力层膨出	穿孔或后弹力层膨出

2.2.4. 实时荧光定量 PCR

1) RNA 的提取、含量及纯度测定

吸除腹腔巨噬细胞培养板中的培养液, 无菌 PBS 冲洗 3 遍, 每孔中加入 500 μ l 的 RNAiso Plus 试剂, 收集细胞转移至 ep 管中, 随后置于至冰盒裂解 30 分钟。颈椎脱臼法处死小鼠后, 取角膜组织置于 ep 管中, 并在管内加入 500 μ l 的 RNAiso Plus 试剂, 使用超声细胞破碎仪破碎角膜组织, 并置于冰盒裂解 2 小时。样本充分裂解后, 离心(4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm) 10 分钟, 提取上清液至新 ep 管中。管内加入 100 μ l 氯仿, 振荡混匀, 离心(4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm) 15 分钟, 提取上清液至新 ep 管中。管内加入等体积的异丙醇, 振荡混匀, 静置 10 分钟后离心(条件同上), 弃上清液, 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀。重复振荡混匀, 离心 10 分钟后弃上清液, ep 管于室温下干燥, 待管内液体完全蒸发后, 加入适量 DEPC 水溶解沉淀, 移液枪充分吹打混匀, 立即使用酶标仪测定 RNA 浓度及纯度。

2) 逆转录

按照产品使用说明, 使用 HiScript III RT 试剂将 RNA 样本逆转录合成 cDNA 样本。

3) PCR

按照产品使用说明, 使用 SYBR 试剂盒制备 PCR 反应体系, 见表 2。以 β -actin 为内参, 使用 Roche PCR 仪完成 PCR 扩增反应, 具体反应条件为: 预变性(95 $^{\circ}$ C, 30 s) \rightarrow 变性(95 $^{\circ}$ C, 45 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s) \rightarrow 退火、延伸(95 $^{\circ}$ C, 15 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s) \rightarrow 溶解(95 $^{\circ}$ C, 15 s)。相应 PCR 引物序列见表 3。

2.2.5. 巨噬细胞内 ROS 含量的测量

巨噬细胞接种于 96 孔板, 使用含有 160 μ g/mL 丁香酚或 0.05% DMSO 的培养液预处理 2 小时。加入灭活菌丝后, 分别在第 0、1、2、4、8、16、24 小时加入 DCFH-DA 探针孵育 20 分钟, PBS 洗涤 3 次, 使用分光光度计以 488 nm 激发波长、525 nm 发射波长测定荧光强度。

Table 2. PCR reaction system**表 2.** PCR 反应体系

试剂	体积
SYBR	10 μ l
DEPC 水	7 μ l
DNA 模板	2 μ l
目的基因上游引物	0.5 μ l
目的基因下游引物	0.5 μ l

Table 3. PCR primer sequence
表 3. PCR 引物序列

Gene	Primer Sequence (5'-3')	Gen Bank
β -actin (mouse)	F: GATTACTGCTCTGGCTCCTAGC R: GACTCATCGTACTCCTGCTTGC	NM_007393.5
IL-1 β (mouse)	F: CGCAGCAGCACATCAACAAGAGC R: TGTCTCATCCTGGAAGGTCCACG	NM_008361.4
TNF- α (mouse)	F: ACCCTCACACTCAGATCATCTT R: GGTTGTCTTTGAGATCCATGC	NM_013693.3
IL-10 (mouse)	F: TGCTAACCGACTCCTTAATGCAGGAC R: CCTTGATTTCTGGGCCATGCTTCTC	NM_010548.2
TLR2 (mouse)	F: CTCCTGAAGCTGTTGCGTTAC R: TACTTTACCCAGCTCGTCACTAC	NM_011905.3
iNOS (mouse)	F: TCCTCACTGGGACAGCACAGAATG R: GTGTCATGCAAAATCTCTCCACTGCC	NM_010927.3

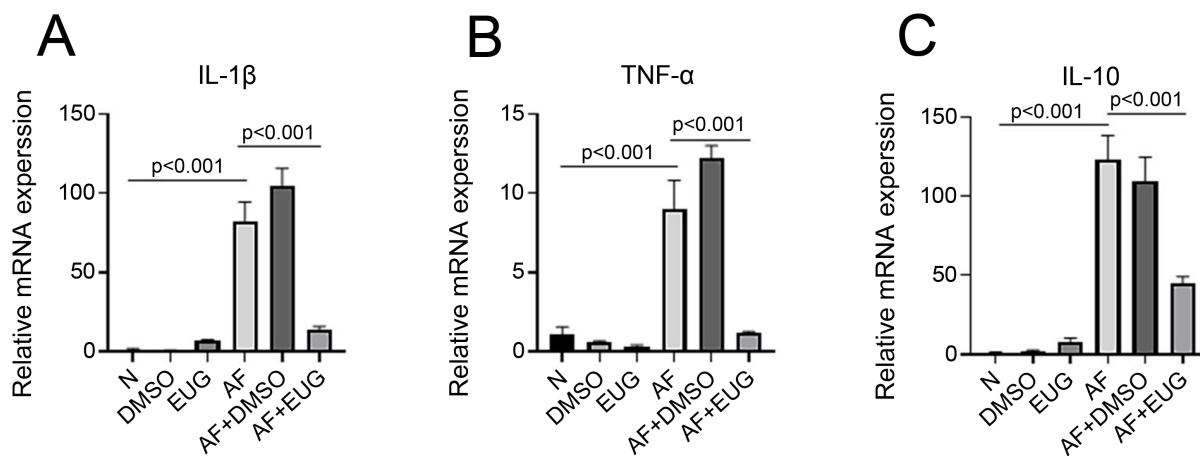
2.3. 统计学分析

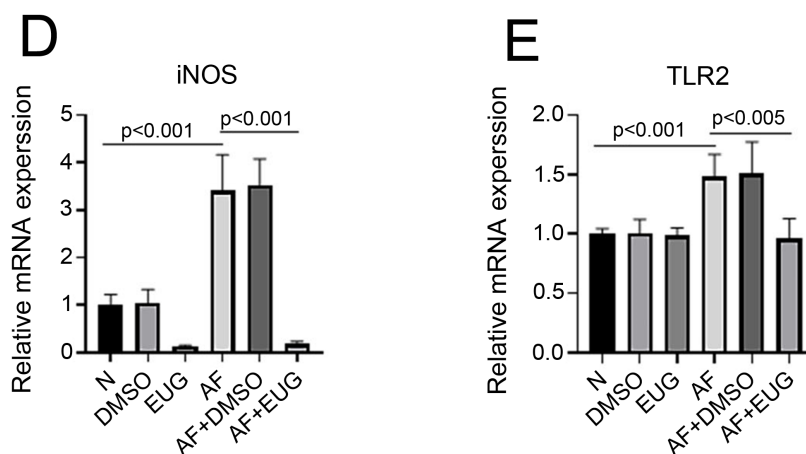
使用 GraphPad Prism 8 对实验数据进行分析。两组间比较使用未配对双尾 t 检验, 多组比较使用 One-way ANOVA 检验。P < 0.05 认为具有统计学意义。实验数据以 $x \pm s$ 表示。

3. 结果

3.1. 丁香酚抑制腹腔巨噬细胞中炎症因子及模式识别受体 TLR2 的表达

PCR 结果显示, 加入灭活的烟曲霉菌丝 8 小时后, 小鼠腹腔巨噬细胞中 IL-1 β (图 1(A))、TNF- α (图 1(B))、IL-10 (图 1(C))、iNOS (图 1(D)) 等炎症因子的 mRNA 表达较正常组明显增高, 而丁香酚预处理显著抑制了以上炎症因子的表达, 差异具有统计学意义。此外, 烟曲霉菌丝刺激的巨噬细胞中, 模式识别受体 TLR2 (图 1(E)) 的 mRNA 表达水平明显增高, 丁香酚预处理显著降低了 TLR2 的表达, 差异具有统计学意义。



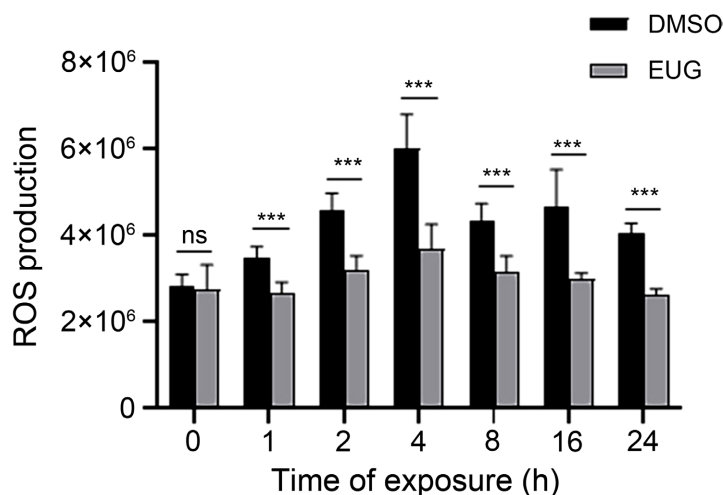


注: (A)~(D) 灭活的烟曲霉菌菌丝刺激小鼠腹腔巨噬细胞, EUG 预处理组的细胞中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、iNOS 的 mRNA 表达较 DMSO 处理组降低; (E) EUG 预处理组的模式识别受体 TLR2 的表达较 DMSO 组降低(n = 6/组)。

Figure 1. EUG inhibited the expressions of pro-inflammatory cytokines and TLR2 in *A. fumigatus*-stimulated macrophages
图 1. 丁香酚抑制烟曲霉菌刺激的腹腔巨噬细胞中炎症因子及模式识别受体 TLR2 的表达

3.2. 丁香酚抑制腹腔巨噬细胞中 ROS 的产生

为探讨丁香酚对氧化应激的作用, 我们使用 DCFH-DA 探针检测巨噬细胞中 ROS 的表达水平。结果(图 2)显示, 加入灭活的烟曲霉菌菌丝后, 细胞中 ROS 的表达量自第 1 小时开始上升, 于 4 小时后达高峰, 至第 24 小时仍高于正常水平。与对照组相比, 在加入灭活菌丝后第 1、2、4、8、16 和 24 小时, 丁香酚处理的巨噬细胞中 ROS 的表达量均下降。



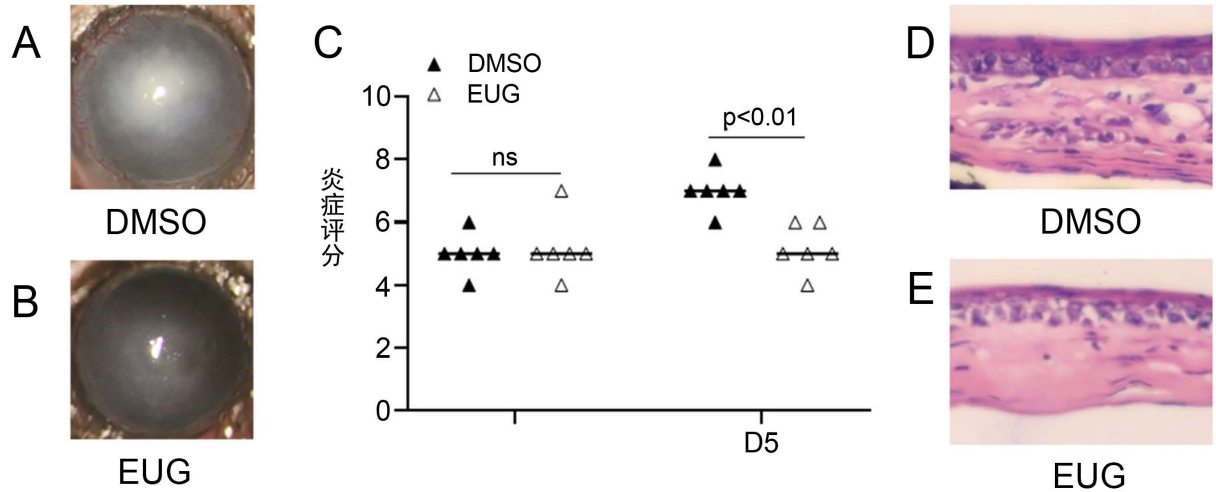
注: 灭活的烟曲霉菌菌丝刺激小鼠腹腔巨噬细胞, 分别在第 0、1、2、4、8、16、24 小时检测细胞中 ROS 含量, 与 DMSO 组相比, EUG 预处理组的细胞中 ROS 表达显著降低(n = 6/组) (***) (***p < 0.001)。

Figure 2. Eugenol inhibited the expression of ROS in *A. fumigatus*-stimulated macrophages
图 2. 丁香酚抑制腹腔巨噬细胞中 ROS 的产生

3.3. 丁香酚改善小鼠真菌性角膜炎的严重程度

建立真菌性角膜炎小鼠模型, 分别使用 DMSO 及丁香酚处理 5 天后, 使用裂隙灯进行角膜拍照并摘取角膜行 HE 染色。结果显示, 在真菌感染 5 天后, DMSO 处理的小鼠角膜(图 3(A))溃疡面积较大, 角

膜水肿较重; 丁香酚处理的小鼠角膜(图 3(B))溃疡面积较对照组减小, 角膜水肿减轻。经丁香酚处理的小鼠角膜炎症评分较对照组明显降低(图 3(C))。角膜组织切片的 HE 染色显示, 丁香酚处理的角膜(图 3(E))中炎症细胞浸润程度较 DMSO 组(图 3(D))明显减轻。以上结果表明, 丁香酚显著减轻了小鼠角膜炎的严重程度。

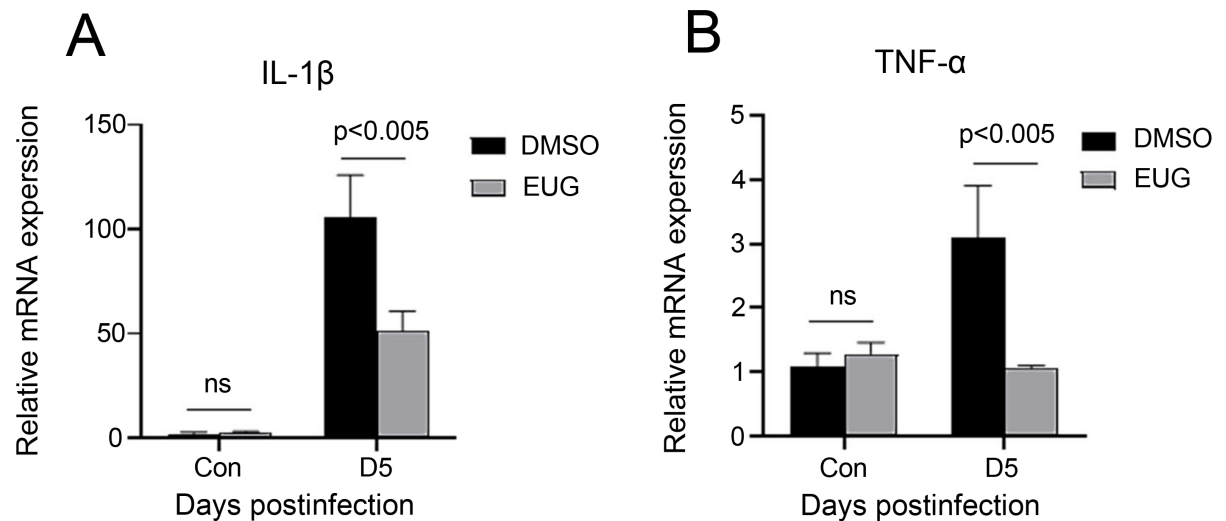


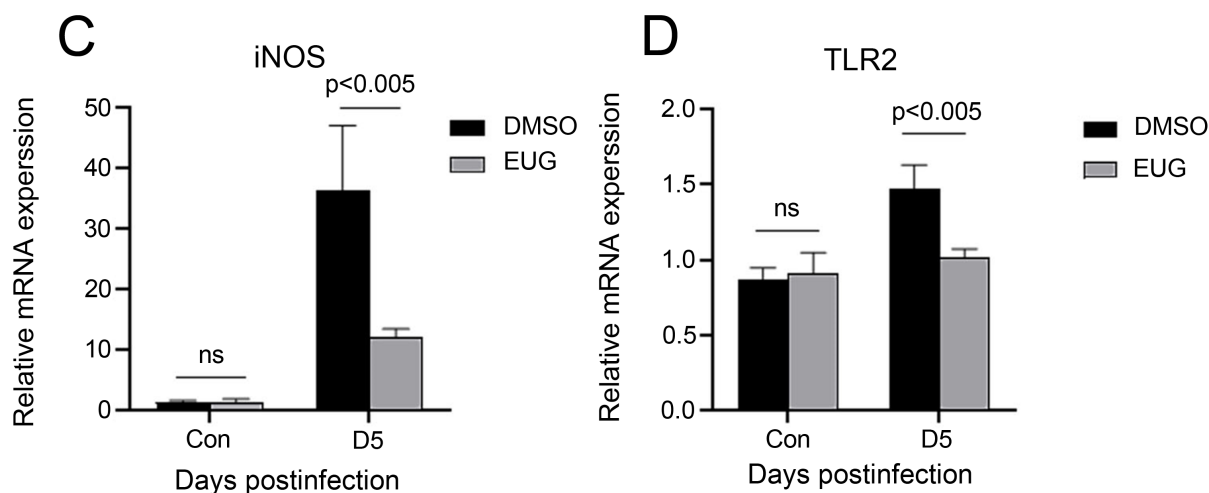
注: (A) 感染后第 5 天, DMSO 处理的小鼠角膜的代表性裂隙灯照片; (B) 感染后第 5 天, EUG 处理的小鼠角膜的代表性裂隙灯照片; (C) 用 DMSO 或 EUG 处理的小鼠角膜炎症评分; (D) 感染后第 5 天, DMSO 处理的小鼠角膜的代表性 HE 染色图像; (E) 感染后第 5 天, EUG 处理的小鼠角膜的代表性 HE 染色图像(n = 6/组)。

Figure 3. Eugenol treatment alleviates the severity of mouse *A. fumigatus* keratitis
图 3. 丁香酚改善小鼠真菌性角膜炎的严重程度

3.4. 丁香酚抑制烟曲霉菌性角膜炎小鼠角膜中炎症因子及 TLR2 的表达

建立真菌性角膜炎小鼠模型, 分别使用 DMSO 及丁香酚处理 5 天后, 收集小鼠角膜并测定角膜中炎症因子及模式识别受体 TLR2 的 mRNA 表达水平。结果显示, 在感染 5 天后, 丁香酚处理的小鼠角膜中炎症因子 IL-1 β (图 4(A))、TNF- α (图 4(B))、iNOS (图 4(C))的表达较 DMSO 处理组明显降低, 差异具有统计学意义。此外, 丁香酚显著抑制了烟曲霉菌性角膜炎小鼠角膜中模式识别受体 TLR2 (图 4(D))的 mRNA 表达。





注: (A)~(D) 烟曲霉菌感染小鼠角膜后第 5 天, 与 DMSO 组相比, EUG 处理组小鼠角膜中 IL-1 β 、TNF- α 、iNOS、TLR2 的表达显著降低(n = 6/组)。

Figure 4. Eugenol inhibited the expressions of inflammatory factors and TLR2 in mice *A. fumigatus* keratitis

图 4. 丁香酚抑制烟曲霉菌性角膜炎小鼠角膜中炎症因子及 TLR2 的表达

4. 讨论

真菌性角膜炎是一种常见的角膜感染, 严重影响视力, 甚至导致眼球摘除。在真菌性角膜炎的发展过程中, 角膜组织内大量炎症介质生成、模式识别受体激活, 激发免疫介导的炎症反应和氧化应激。过度的炎症反应和氧化应激对角膜组织产生了严重的破坏, 是导致永久性视力损伤的重要原因, 单纯的抗真菌治疗无法达到理想的治疗效果。

丁香酚是由丁香类植物中提取的植物活性成分, 已被报道具有很好的抗炎、抗氧化、抗感染等活性。不仅如此, 研究表明丁香酚与标准抗真菌药物联合使用, 可以在减轻炎症反应的同时, 减少抗真菌药的用药剂量、最大限度的减少不良反应, 改善疾病的预后[15][16]。在本实验研究中, 丁香酚有效减轻了真菌性角膜炎小鼠角膜中炎症细胞的浸润程度, 并抑制角膜中炎症因子(IL-1 β 、TNF- α 、iNOS)、腹腔巨噬细胞中炎症因子(IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、iNOS)的表达, 表明丁香酚具有一定的抗炎作用。有研究表明, 在小鼠胰腺炎模型中, 丁香酚有效抑制了 IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子的表达[17], 这与我们的实验结果一致。不仅如此, 丁香酚显著减少了烟曲霉菌刺激引起的巨噬细胞中活性氧的产生, 表明丁香酚具有一定的抗氧化作用。

先天免疫是宿主抵御病原微生物的第一道防线。模式识别受体(如 Toll 样受体、C 型凝集素受体等)是先天免疫的重要组成成分, 负责识别病原体中的病原体相关分子模式, 并介导中性粒细胞的聚集、趋化因子的产生, 促进炎症反应[18]。Toll 样受体是一种重要的模式识别受体, 在巨噬细胞抗真菌反应中发挥重要作用[19]。我们的研究结果显示, 烟曲霉菌刺激可引起腹腔巨噬细胞中 TLR2 的表达增高。与 DMSO 对照组相比, 丁香酚预处理可显著抑制 TLR2 的表达增高。不仅如此, 在小鼠角膜炎模型中, 在感染后第五天, 丁香酚处理的角膜中 TLR2 的表达较对照组明显下降。这提示丁香酚对炎症因子表达的抑制作用可能与下调模式识别受体 TLR2 的表达有关。

综上所述, 丁香酚可以改善烟曲霉菌性小鼠角膜炎的严重程度, 抑制烟曲霉菌感染的小鼠角膜中炎症因子、模式识别受体 TLR2 的表达, 减轻炎症细胞的浸润; 减少烟曲霉菌刺激的巨噬细胞中炎症因子、TLR2 的表达及 ROS 的产生。以上结果表明, 丁香酚可以在小鼠烟曲霉菌性角膜炎中发挥抗炎、抗氧化的作用, 其作用在小鼠模型和巨噬细胞实验中均得到证实, 表明丁香酚有望成为真菌性角膜炎

抗炎治疗的新型药物; 丁香酚的抗炎作用可能与下调 TLR2 的表达有关, 但其具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Mahmoudi, S., Masoomi, A., Ahmadikia, K., Tabatabaei, S.A., Soleimani, M., Rezaie, S., Ghahvechian, H. and Banafsheafshan, A. (2018) Fungal Keratitis: An Overview of Clinical and Laboratory Aspects, *Mycoses*, **61**, 916-930. <https://doi.org/10.1111/myc.12822>
- [2] Bourcier, T., Sauer, A., Dory, A., Denis, J. and Sabou, M. (2017) Fungal Keratitis. *Journal Français D'Ophtalmologie*, **40**, e307-e313. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2017.08.001>
- [3] Montgomery, M.L. and Fuller, K.K. (2020) Experimental Models for Fungal Keratitis: An Overview of Principles and Protocols. *Cells*, **9**, 1713. <https://doi.org/10.3390/cells9071713>
- [4] Brown, L., Leck, A.K., Gichangi, M., Burton, M.J. and Denning, D.W. (2021) The Global Incidence and Diagnosis of Fungal Keratitis. *The Lancet Infectious Diseases*, **21**, e49-e57. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30448-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30448-5)
- [5] Chidambaram, J.D., Kannambath, S., Srikanthi, P., Shah, M., Lalitha, P., Elakkiya, S., Bauer, J., Prajna, N.V., Holland, M.J. and Burton, M.J. (2017) Persistence of Innate Immune Pathways in Late Stage Human Bacterial and Fungal Keratitis: Results from a Comparative Transcriptome Analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **7**, 193. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00193>
- [6] Niu, L., Liu, X., Ma, Z., Yin, Y., Sun, L., Yang, L. and Zheng, Y. (2020) Fungal Keratitis: Pathogenesis, Diagnosis and Prevention. *Microbial Pathogenesis*, **138**, Article ID: 103802. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103802>
- [7] Jadhav, B.K., Khandelwal, K.R., Ketkar, A.R. and Pisal, S.S. (2004) Formulation and Evaluation of Mucoadhesive Tablets Containing Eugenol for the Treatment of Periodontal Diseases. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **30**, 195-203. <https://doi.org/10.1081/DDC-120028715>
- [8] Chatterjee, D. and Bhattacharjee, P. (2015) Use of Eugenol-Lean Clove Extract as a Flavoring Agent and Natural Antioxidant in Mayonnaise: Product Characterization and Storage Study. *Journal of Food Science and Technology*, **52**, 4945-4954. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1573-6>
- [9] Ahmad, N., Ahmad, F.J., Bedi, S., Sharma, S., Umar, S. and Ansari, M.A. (2019) A Novel Nanoformulation Development of Eugenol and Their Treatment in Inflammation and Periodontitis. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **27**, 778-790. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.04.014>
- [10] Gülçin, İ. (2011) Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure-Activity Relationship Study. *Journal of Medicinal Food*, **14**, 975-985. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0197>
- [11] das Chagas Pereira de Andrade, F. and Mendes, A.N. (2020) Computational Analysis of Eugenol Inhibitory Activity in Lipoyxygenase and Cyclooxygenase Pathways. *Scientific Reports*, **10**, Article No. 16204. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73203-z>
- [12] Ulanowska, M. and Olas, B. (2021) Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 3671. <https://doi.org/10.3390/ijms22073671>
- [13] Huang, X., Liu, Y., Lu, Y. and Ma, C. (2015) Anti-Inflammatory Effects of Eugenol on Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Reaction in Acute Lung Injury via Regulating Inflammation and Redox Status. *International Immunopharmacology*, **26**, 265-271. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.03.026>
- [14] Yeh, J.L., Hsu, J.H., Hong, Y.S., Wu, J.R., Liang, J.C., Wu, B.N., Chen, I.J. and Liou, S.F. (2011) Eugenol and Glyceryl-Isoeugenol Suppress LPS-Induced iNOS Expression by Down-Regulating NF-kappaB and AP-1 through Inhibition of MAPKS and AKT/IkappaBalpha Signaling Pathways in Macrophages. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, **24**, 345-356. <https://doi.org/10.1177/039463201102400208>
- [15] Ahmad, A., Khan, A., Khan, L.A. and Manzoor, N. (2010) *In Vitro* Synergy of Eugenol and Methyleugenol with Fluconazole against Clinical Candida Isolates. *Journal of Medical Microbiology*, **59**, 1178-1184. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.020693-0>
- [16] Ahmad, A., Wani, M.Y., Khan, A., Manzoor, N. and Molepo, J. (2015) Synergistic Interactions of Eugenol-Tosylate and Its Congeners with Fluconazole against *Candida albicans*. *PLoS ONE*, **10**, e0145053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145053>
- [17] Fonsêca, D.V., Salgado, P.R., Aragão Neto Hde, C., Golzio, A.M., Caldas Filho, M.R., Melo, C.G., Leite, F.C., Piuvezam, M.R., Pordeus, L.C., Barbosa Filho, J.M. and Almeida, R.N. (2016) Ortho-Eugenol Exhibits Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Activities. *International Immunopharmacology*, **38**, 402-408. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.06.005>
- [18] Huan, Y., Peng, X.D., Lin, J., Zhang, Y.X., Zhan, L., Gao, H. and Zhao, G.Q. (2020) Anti-Inflammatory Effects of

Astaxanthin against Fungal Keratitis. *International Journal of Ophthalmology*, **13**, 1681-1688.

- [19] Viriyakosol, S., Fierer, J., Brown, G.D. and Kirkland, T.N. (2005) Innate Immunity to the Pathogenic Fungus *Coccidioides posadasii* Is Dependent on Toll-Like Receptor 2 and Dectin-1. *Infection and Immunity*, **73**, 1553-1560.
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1553-1560.2005>