

丁香酚通过 PI3K/AKT 信号通路减轻镰刀菌诱导的角膜炎症

丁辉, 胡施思, 杨镇朵, 陈晓丹

引用: 丁辉, 胡施思, 杨镇朵, 等. 丁香酚通过 PI3K/AKT 信号通路减轻镰刀菌诱导的角膜炎症. 国际眼科杂志, 2024, 24(8): 1194-1199.

基金项目: 海南省重点研发计划项目 (No.ZDYF2021SHFZ232)
作者单位: (570311) 中国海南省海口市, 海南省眼科医院近视屈光专科 海南省眼科学重点实验室
作者简介: 丁辉, 毕业于中山大学, 博士, 副主任医师, 近视屈光专科主任, 研究方向: 眼视光、眼表角膜病。
通讯作者: 丁辉. alge5350@21cn.com
收稿日期: 2023-11-17 修回日期: 2024-07-01

摘要

目的: 探讨丁香酚对镰刀菌 (*F. solani*) 诱导的小鼠真菌性角膜炎 (FK) 的保护作用, 并初步探讨可能的潜在机制。

方法: 采用改良的表层镜法制备 FK 小鼠模型。二甲亚砜 (DMSO) 组大鼠右眼结膜囊涂抹等量 DMSO (0.05%)。丁香酚组将丁香酚 (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 涂抹至小鼠右眼结膜囊。类胰岛素生长因子-1 (IGF-1) 组除施用丁香酚外, 还于右眼结膜囊涂抹 PI3K/AKT 通路激活剂 IGF-1 (10 nmol/mL)。分别在接种镰刀菌悬液的第 1、3、5 d, 于裂隙灯显微镜下观察角膜形态。采用苏木精伊红 (HE) 染色评估角膜组织病理损伤。测定角膜组织载菌量。酶联免疫吸附试验和蛋白免疫印迹用于分析炎症介质白介素-6 (IL-6) 和白介素-1 β (IL-1 β) 的水平和 PI3K/AKT 通路蛋白的表达。

结果: 丁香酚治疗可改善 FK 小鼠的角膜炎形态症状和炎症反应, 减轻角膜病理组织损伤和真菌负荷。在镰刀菌感染 3 d, 与 DMSO 组相比, 丁香酚组角膜组织 IL-6 水平明显升高, 而 IL-1 β 水平明显降低 (均 $P < 0.05$); 且丁香酚组角膜组织 IL-6 水平明显高于 IGF-1 组, IL-1 β 水平明显低于 IGF-1 组 (均 $P < 0.05$)。在感染 5 d, 丁香酚组角膜组织中 IL-6 和 IL-1 β 水平均明显低于 DMSO 组和 IGF-1 组 ($P < 0.05$)。与 DMSO 组相比, 丁香酚组角膜组织中 p-PI3K 和 p-Akt 表达均明显降低 ($P < 0.05$); 且丁香酚组角膜组织 p-PI3K 和 p-Akt 表达明显低于 IGF-1 组 (均 $P < 0.05$)。

结论: 丁香酚可能通过抑制 PI3K/AKT 通路来减轻镰刀菌引起的角膜炎症, 对小鼠镰刀菌角膜炎具有保护作用。

关键词: 丁香酚; 真菌性角膜炎; PI3K/AKT 通路; 炎症反应; 真菌载量

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2024.8.03

Eugenol attenuates the inflammation of *Fusarium*-induced keratitis through PI3K/AKT signaling pathway

Ding Hui, Hu Shisi, Yang Zhenduo, Chen Xiaodan

Foundation item: Key Research and Development Project of Hainan

Province (No.ZDYF2021SHFZ232)

Department of Myopia and Optometry, Hainan Eye Hospital; Hainan Key Laboratory of Ophthalmology, Haikou 570311, Hainan Province, China

Correspondence to: Ding Hui. Department of Myopia and Optometry, Hainan Eye Hospital; Hainan Key Laboratory of Ophthalmology, Haikou 570311, Hainan Province, China. alge5350@21cn.com

Received: 2023-11-17 Accepted: 2024-07-01

Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effect of eugenol against *Fusarium solani* (*F. solani*) - induced fungal keratitis (FK) in mice and to preliminarily explore possible underlying mechanisms.

• **METHODS:** A modified epifluorescence microscopy method was used to prepare the FK mouse model. An equal amount of DMSO (0.05%) was applied to the conjunctiva of the right eye of rats in the dimethyl sulfoxide (DMSO) group. The eugenol group was prepared by applying eugenol (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to the conjunctival sac of the right eye of mice. The insulin-like growth factor-1 (IGF-1) group was coated with the PI3K/AKT pathway activator IGF-1 (10 nmol/mL) in the conjunctival sac of the right eye in addition to the administration of eugenol. The corneal morphology was observed under a slit-lamp microscope on days 1, 3, and 5 of inoculation with *F. solani* suspension, respectively. Hematoxylin eosin (HE) staining was used to assess corneal histopathological damage. The bacterial load of corneal tissue was determined. Enzyme-linked immunosorbent assay and Western blot were used to analyze the levels of inflammatory mediators interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β) and the expression of PI3K/AKT pathway proteins.

• **RESULTS:** Eugenol treatment improved the morphological symptoms of keratitis and inflammatory response in FK mice, and reduced corneal pathologic tissue damage and fungal load. At 3 d after *F. solani* infection, corneal tissue IL-6 levels were significantly higher and IL-1 β levels were significantly lower in the eugenol group compared with the DMSO group (both $P < 0.05$); corneal tissue IL-6 levels were significantly higher and IL-1 β levels were significantly lower in the eugenol group than in the IGF-1 group (both $P < 0.05$). At 5 d after infection, both IL-6 and IL-1 β levels in corneal tissue of the eugenol group were significantly lower than those of

the DMSO and IGF-1 groups ($P<0.05$); compared with the DMSO group, the expression of p-PI3K and p-Akt in the corneal tissues of the eugenol group was significantly reduced ($P<0.05$); the expression of p-PI3K and p-Akt in corneal tissues was significantly lower in the eugenol group than that of the IGF-1 group (both $P<0.05$).

• **CONCLUSION:** Eugenol may attenuate *F.solani*-induced corneal inflammation by inhibiting the PI3K/AKT pathway, and it has a protective effect against *F.solani* keratitis in mice.

• **KEYWORDS:** eugenol; fungal keratitis; PI3K/AKT pathway; inflammatory response; fungal load

Citation: Ding H, Hu SS, Yang ZD, et al. Eugenol attenuates the inflammation of *Fusarium* - induced keratitis through PI3K/AKT signaling pathway. *Guoji Yanke Zazhi* (Int Eye Sci), 2024,24(8): 1194-1199.

0 引言

真菌性角膜炎(FK)是由致病真菌引起的一种侵袭性角膜感染性疾病,通常会导致严重的视力损害,甚至伤害整个眼球^[1]。FK的致病菌主要是镰刀菌、曲霉菌和念珠菌,其中茄病镰刀菌(*F.solani*)是中国导致FK的主要病原微生物,占25%-73.3%^[2]。研究表明,临床治疗FK的疗效主要取决于人体清除病原真菌的能力和病原细菌的毒力。然而,由于毒性、副作用和耐药性的产生,现有药物在抗真菌治疗中的临床效果十分有限。开发新的有效抗真菌药物对于FK的治疗具有重要临床价值。磷脂酰肌醇3-激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(PI3K/AKT)通路是体内研究最广泛的信号通路之一,参与调控多种生物学功能^[3]。近年来对该通路的研究表明其参与不同微生物的感染和致病过程,并在多种角膜疾病中发挥作用^[4]。基于PI3K/AKT通路探讨与真菌感染的免疫调节和角膜免疫抗真菌感染相关的药物可能为FK的治疗提供新思路。丁香酚(4-烯丙基-2-甲氧基苯酚)是苯丙烷类化合物和丁香的主要成分,已被证实具有广泛的药理学活性,包括抗炎、抗氧化、抗肿瘤和抗真菌等^[5-6]。然而,其在镰刀菌感染引起的FK中的作用尚未见报道。基于此,本研究旨在探讨丁香酚对镰刀菌诱导的小鼠FK的保护作用,并观察PI3K/AKT通路和炎症反应的变化,以期为疾病的治疗提供一定参考价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 **实验动物** SPF级雄性Balb/c小鼠(20-22 g, 8-10周龄)54只购自安徽智飞龙科马生物制药有限公司[许可证号SYXK(皖)2019-007]。实验前通过裂隙灯显微镜观察小鼠角膜确定角膜无任何病变,以每只小鼠的左眼作为空白对照,右眼用于造模。动物的饲养条件和实验过程均符合视觉与科学研究协会制定的科研动物使用规范。本研究经医院伦理审批委员会讨论通过(2023-029-01)。

1.1.2 **药物及主要试剂** 茄病镰刀菌标准菌株(编号AS3.1829)购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。丁香酚($C_{10}H_{12}O_2$, $\geq 98\%$, 产品编号CFN99175)购自武汉ChemFaces公司,见图1。将丁香酚以640 mg/mL

作为储备溶液溶解在二甲基亚砜(DMSO)中,并调整浓度为160 $\mu\text{g/mL}$ 备用。小鼠白介素-6(IL-6)和白介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附试剂盒购自碧云天生物科技有限公司。PI3K/Akt通路激活剂类胰岛素生长因子-1(IGF-1)购自Sigma公司。抗PI3K抗体、抗磷酸化PI3K(p-PI3K)抗体、抗Akt抗体、抗磷酸化Akt(p-Akt)抗体、抗GAPDH抗体分别购自R&D Systems(Minneapolis, MN)、Epitomics(Burlingame, CA)、Cell Signaling Technology(Danvers, MA)和Sigma(St. Louis, MO)公司。

1.2 方法

1.2.1 **真菌菌液制备** 将冷冻干燥镰刀菌菌种溶解于无菌生理盐水中制备悬浮液,将镰刀菌悬浮液接种于Sabouroud低糖琼脂斜面培养基(4%葡萄糖、1.0%蛋白胨, pH4.0-6.0)中,置于28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养7 d。将生长良好的镰刀菌菌种置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。造模前1 wk,将冷藏的镰刀菌菌种转移至28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养2 d,随后接种于Sabouroud低糖琼脂斜面培养基中培养3 d。取出培养基,用2 mL无菌生理盐水冲洗菌面,收集含真菌孢子和菌丝成分的镰刀菌混悬液。镰刀菌混悬液经0.9%无菌生理盐水稀释后,于红细胞计数板上对镰刀菌分生孢子数进行计数,调整接种浓度为 10^8 集落形成单位(colony forming unit)/毫升。镰刀菌混悬液需即配即用。

1.2.2 **分组及处理** 将小鼠随机分为3组,每组18只: DMSO组、丁香酚组、IGF-1组。丁香酚组将4 μL 丁香酚(160 $\mu\text{g/mL}$)涂抹至小鼠右眼结膜囊进行治疗,每天3次^[7]。IGF-1组除使用丁香酚外,还于右眼结膜囊涂抹4 μL PI3K/AKT通路激活剂IGF-1(10 nmol/mL),每天1次。DMSO组小鼠右眼结膜囊涂抹等量DMSO(0.05%)。

1.2.3 **模型构建** 采用改良的表层镜法^[8]制备FK小鼠模型。小鼠经0.6%戊巴比妥钠麻醉后,修剪胡须。使用0.4%盐酸奥布卡因滴眼液滴入小鼠右眼进行浅表麻醉。于手术显微镜下,用镊子固定小鼠眼睛,暴露小鼠右眼角膜,结膜下滴入分组药物。1 h后,用电动角膜上皮刮板刮除角膜上皮,使用微型注射器在右眼角膜基质注射2.5 μL 镰刀菌悬浮液。随后,在小鼠的角膜表面覆盖软性角膜接触镜。为确保建模的均一性及稳定性,用7-0缝线在眼睑中央缝合一针使其闭合。术后,于睑裂表面涂氧氟沙星眼膏。术后24 h拆除眼睑缝线,取出软性角膜接触镜。分别在接种镰刀菌悬浮液的第1、3、5 d,每组各随机选择6只小鼠,裂隙灯下观察角膜形态,并对角膜病理改变进行临床评分,然后注射过量麻醉剂处死小鼠,收集右眼角膜组织,一部分角膜组织用于组织病理学分析[苏木精伊红染色(HE)],一部分角膜组织制备匀浆,用于载菌量检测、酶联免疫吸附试验(ELISA)和蛋白免疫印迹分析。

1.2.4 **角膜形态检查及临床评分** 于HAAG-STREIT型裂隙灯显微镜下观察角膜形态,采用I-IV级评分对角膜病理改变进行临床评分,单个眼角膜临床评分为三项观察指标的分级相加所得总分,量化标准见表1^[8]。

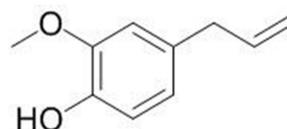


图1 丁香酚的化学结构式。

1.2.5 HE 染色 将小鼠角膜组织用4%甲醛固定过夜。在梯度乙醇中脱水后,石蜡包埋,切片(厚度5 μm),二甲苯脱蜡,梯度乙醇再水化,漂洗5次。将组织切片浸入苏木精溶液中染色5 min,然后在伊红溶液中浸泡2 min,梯度酒精脱水,中性树脂封片。在光学显微镜下观察切片的病理变化。

1.2.6 角膜组织载菌量检测 角膜匀浆液配制:取10 mL Na₂EDTA 溶液(0.1 mol/L)和50 mL Tris-Cl 溶液,加入440 mL 超纯水充分混匀后,使用0.02 μm 滤过膜抽滤后,除菌,备用。小鼠角膜组织充分剪碎后,加入配制好的角膜匀浆液500 μL,于冰上以18 000 r/min 破碎匀浆30 s。将破碎后的角膜匀浆液以1:100 进行稀释。使用微量进样器吸取50 μL 匀浆液进行涂板,并置于28 °C 恒温箱中培养3 d,随后进行菌落计数。载菌量即为菌落计数乘以稀释倍数。

1.2.7 ELISA 角膜组织匀浆处理后,于3 000 r/min 离心30 s,收集上清液。采用小鼠IL-6(货号PI326)和IL-1β(货号PI301)酶联免疫吸附试剂盒检测上清液中IL-6 和IL-1β 的含量,具体实验步骤参考试剂盒说明书进行操作。

1.2.8 蛋白免疫印迹 将小鼠角膜组织块置于EP 管中,蛋白裂解液(RIPA : PMSF = 100:1)裂解。BCA 法测定蛋白浓度。将20 μg 蛋白质在10% SDS-PAGE 上分离,然后转移到PVDF 膜上。5%脱脂奶封闭2 h,一抗[抗PI3K 抗体(1:1 000)、抗p-PI3K 抗体(1:1000)、抗Akt 抗体

(1:1 000)、抗p-Akt 抗体(1:1 000)、抗GAPDH 抗体(1:2000)]4 °C 孵育过夜,相应二抗室温孵育1 h。采用化学发光法显影,并使用Gel-proAnalyzer 4.5 图像分析软件进行目的条带的灰度分析。

统计学分析:采用SPSS22.0 统计软件对数据进行分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丁香酚对 FK 小鼠角膜形态及临床评分的影响 感染后第3 d,DMSO 组、丁香酚组与IGF-1 组小鼠右眼均表现出明显的FK 临床特征,包括弥漫性角膜水肿、溃疡和炎症,其中丁香酚组病理损害和角膜新生血管反应最轻;感染后第5 d,DMSO 组与IGF-1 组小鼠症状均进一步加重,透明度低,透过病灶窥不见虹膜,而丁香酚组溃疡趋于愈合,病灶区域缩小,炎症减轻,见图2。感染后第3、5 d,与DMSO 组相比,丁香酚组临床评分均明显降低(*P* < 0.05),且丁香酚组临床评分明显低于IGF-1 组(*P* < 0.05),见表2,图3。

2.2 丁香酚对 FK 小鼠角膜病理组织损伤的影响 HE 染色显示,DMSO 组和IGF-1 组小鼠感染第3 d 角膜边缘充血、水肿,角膜增厚和新生血管形成;感染第5 d 可观察到角膜严重损伤,如炎性细胞浸润、局部溃疡或穿孔;丁香酚组小鼠感染第3 d 角膜病理组织损伤较严重,第5 d 炎症症状即明显减轻,见图4。

表1 角膜病理改变进行临床评分

病理改变	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%
混浊程度	虹膜纹理清晰,瞳孔可见角膜轻度混浊	虹膜可见,角膜混浊	虹膜不可见,角膜不均匀混浊	角膜均匀重度混浊
溃疡形态	轻度不规则	轻度水肿、不规则	重度水肿	穿孔或后弹力膨出

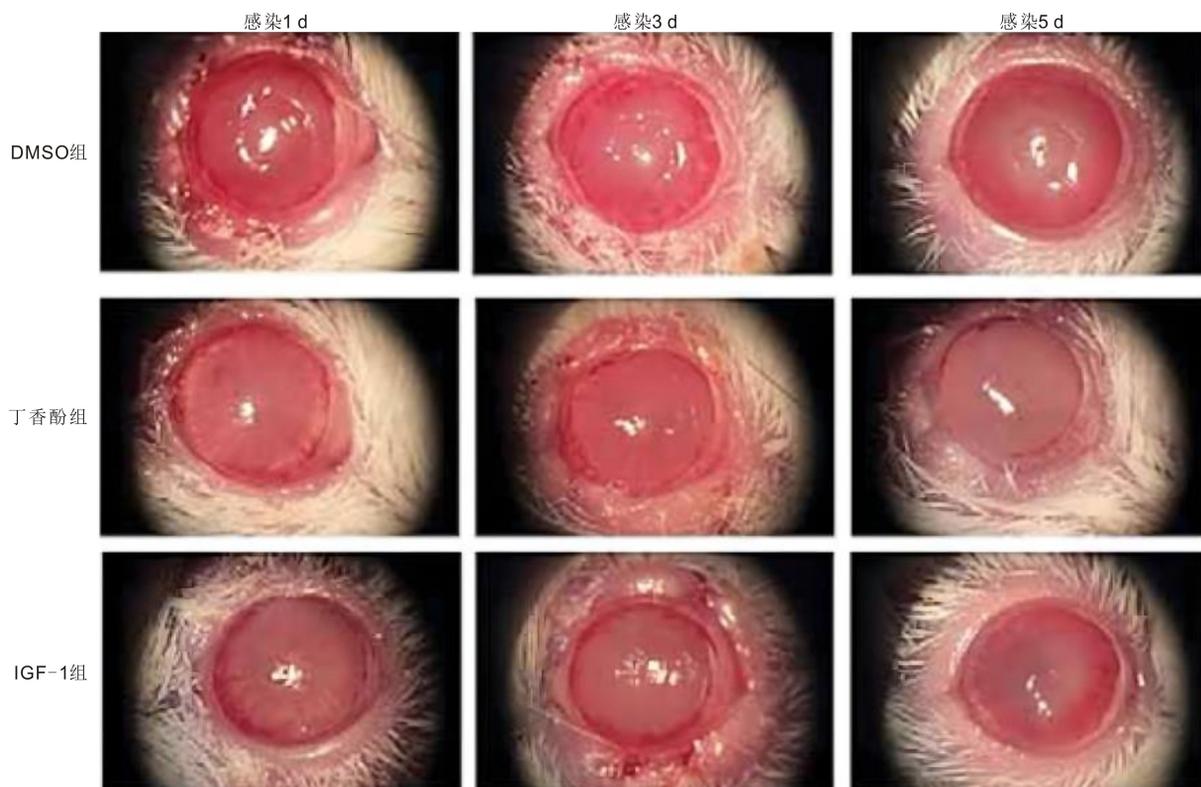


图2 裂隙灯下观察小鼠角膜镰刀菌感染第1、3、5 d 的角膜形态。

表2 小鼠角膜镰刀菌感染第1、3、5 d的临床评分比较

组别	例数	$(\bar{x} \pm s, \text{分})$		
		感染1 d	感染3 d	感染5 d
DMSO组	6	7.83±0.91	9.17±0.69 ^a	7.17±0.37 ^a
丁香酚组	6	7.67±0.85	7.02±0.90	3.16±0.68
IGF-1组	6	7.50±0.50	8.67±1.69 ^a	6.67±1.11 ^a

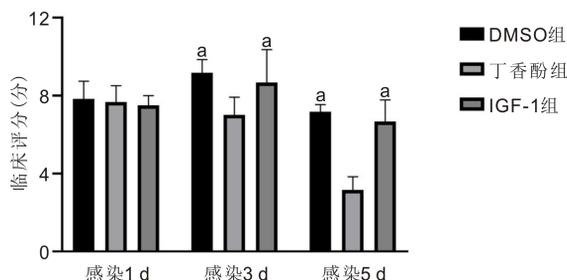
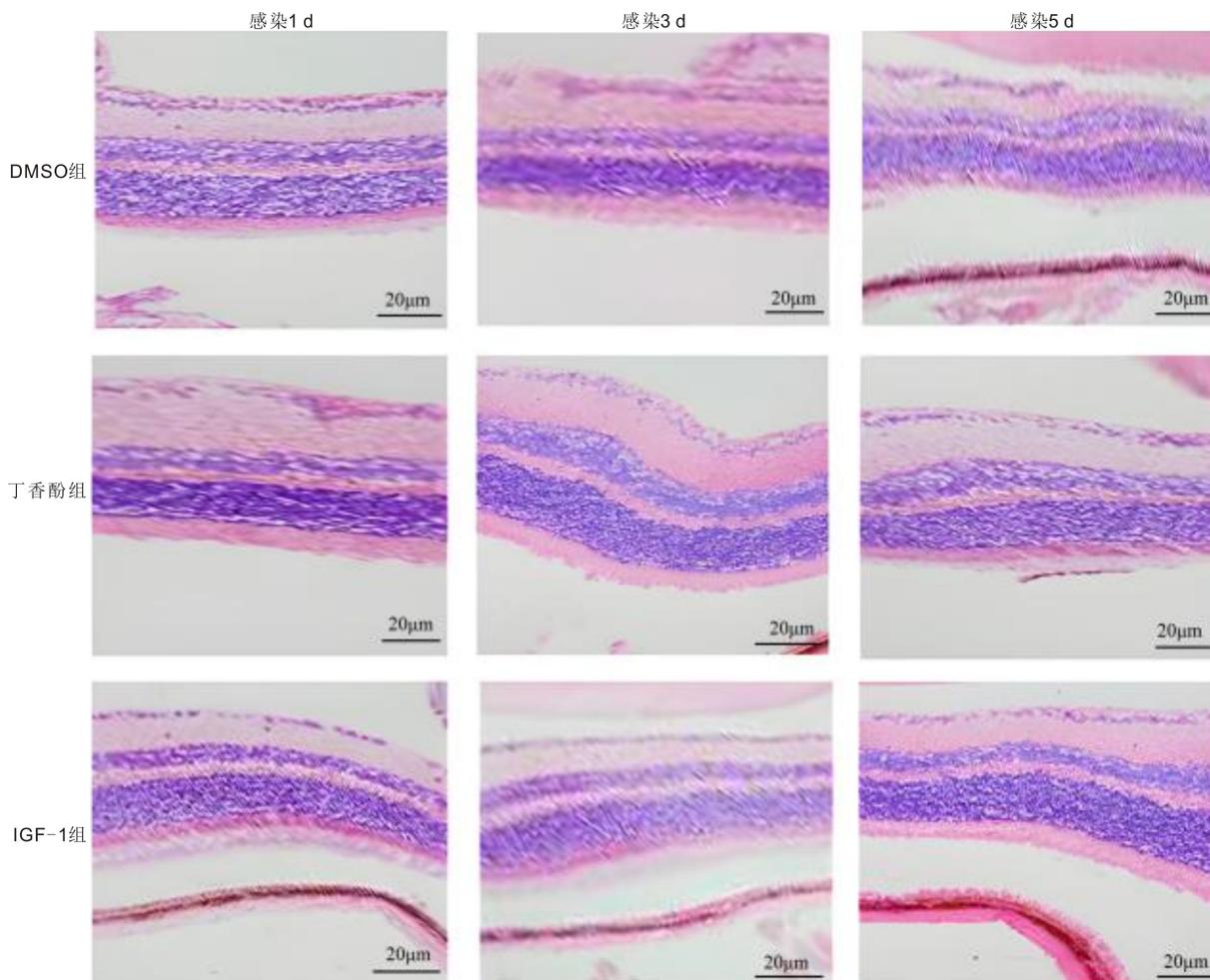
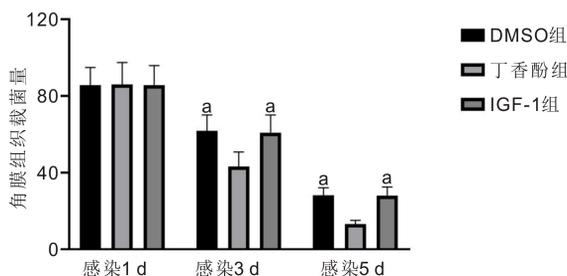
注:^a $P < 0.05$ vs 丁香酚组。图3 小鼠角膜镰刀菌感染第1、3、5 d的临床评分比较
^a $P < 0.05$ vs 丁香酚组。

图4 HE染色观察镰刀菌感染第1、3、5 d的组织病理损伤。

2.3 丁香酚对FK小鼠角膜组织载菌量的影响 各组小鼠角膜真菌载量均随时间推移呈下降趋势。感染第3、5 d,与DMSO组相比,丁香酚组角膜载菌量明显降低(均 $P < 0.05$),且丁香酚组角膜载菌量明显低于IGF-1组(均 $P < 0.05$),见图5。

2.4 丁香酚对FK小鼠角膜组织炎症介质的影响 感染第3 d,与DMSO组相比,丁香酚组角膜组织IL-6水平明显升高,而IL-1 β 水平明显降低(均 $P < 0.05$);丁香酚组角膜组织IL-6水平明显高于IGF-1组,IL-1 β 水平明显低于IGF-1组(均 $P < 0.05$)。感染第5 d,丁香酚组角膜组织中IL-6和IL-1 β 水平均明显低于DMSO组和IGF-1组(均 $P < 0.05$),见图6。

2.5 丁香酚对PI3K/AKT信号通路的影响 感染第3、5 d,与DMSO组相比,丁香酚组角膜组织中p-PI3K和p-Akt表达均明显降低($P < 0.05$),且丁香酚组角膜组织p-PI3K

图5 各组小鼠角膜真菌载量的比较 ^a $P < 0.05$ vs 丁香酚组。

和p-Akt表达明显低于IGF-1组(均 $P < 0.05$),见图7。

3 讨论

FK是一种侵袭性极强的角膜损伤性急症,由于病情发展迅速,通常会导致严重的视力损伤。镰刀菌是中国最常见的FK病原体之一,具有很强的毒力和侵袭性。然

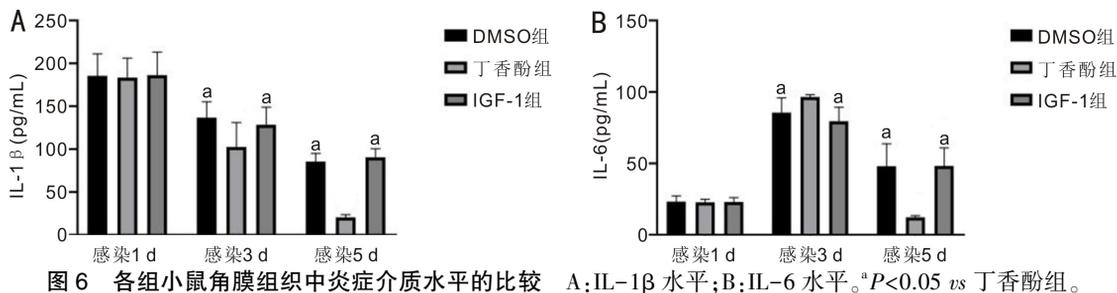


图6 各组小鼠角膜组织中炎症介质水平的比较 A:IL-1β水平;B:IL-6水平。^a*P*<0.05 vs 丁香酚组。

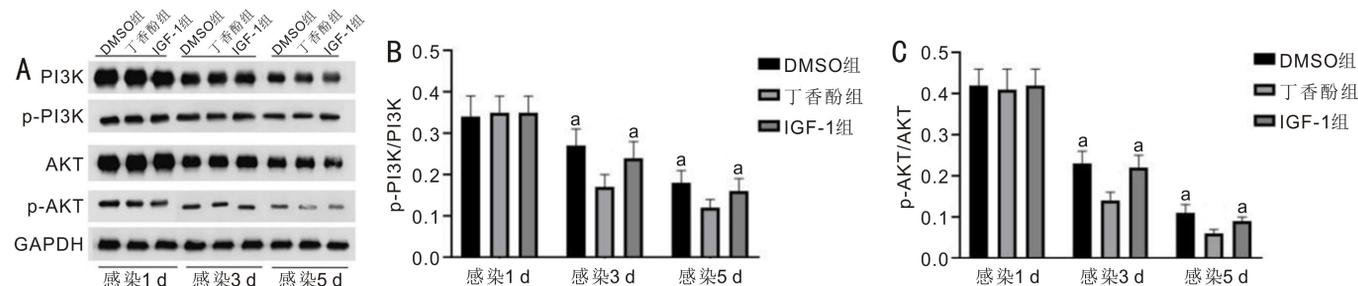


图7 各组小鼠角膜组织中PI3K/AKT通路相关蛋白表达的比较 A:蛋白免疫印迹检测;B:p-PI3K/PI3K水平;C:p-AKT/AKT水平。^a*P*<0.05 vs 丁香酚组。

而,目前临床上尚缺乏针对镰刀菌的有效抗菌药物,因此镰刀菌感染的FK患者预后较差^[9]。探索有效的治疗靶点和药物以调控角膜炎症的发展,对于改善患者预后至关重要。

丁香是一种重要的药用植物,因其广泛的药理作用作为民间医药被广泛使用。丁香油可用于治疗许多疾病,包括痤疮、哮喘、类风湿性关节炎、疤痕、疣和各种过敏症;在牙科医疗实践中,丁香油还被用作镇痛剂、解痉剂和防腐剂^[10-11]。精油的抗菌活性通常取决于其化学成分和每种活性成分的数量,这是所有天然植物提取物的共同特点。丁香酚是从丁香油中分离出的最主要生物活性成分,每100g新鲜植物材料中含有9381.70-14650.00mg的丁香酚^[12],而丁香油的抗菌活性主要与丁香酚含量高有关。丁香酚的抗真菌活性已被广泛研究。早在1982年,Boonchird等^[13]已评估了丁香酚对31株白僵菌和33株新型隐球菌的抗真菌活性进行了评估。Prajapati等^[14]发现,丁香酚可诱导酿酒酵母和白色念珠菌包膜的形态改变,而包膜形态与这些真菌的致病性密切相关。Shahina等^[15]发现,丁香酚可诱导白色念珠菌产生氧化应激反应,造成细胞质膜脂质过氧化和细胞死亡。此外,丁香酚也被证实可在体内和体外对免疫抑制大鼠口腔念珠菌病发挥抗菌活性^[16]。最重要的是,Yu等^[7]证实丁香酚可通过减少真菌负荷来预防烟曲霉角膜炎。本研究发现,与DMSO组小鼠相比,丁香酚处理组小鼠的角膜病理损伤和角膜新生血管反应更轻,角膜真菌清除速度更快,证实了丁香酚对镰刀菌引起的FK的抗真菌作用。

炎症是对抗病原微生物的关键防线。真菌感染早期,角膜即启动依赖于模式受体(PRRs)如Toll样受体(TLRs)的先天性免疫应答^[17-18]。PRRs的激活会引发各种炎症事件,包括炎症细胞的浸润和促炎细胞因子(如TNF-α、IL-1β和IL-6)的产生。这些PRRs介导的炎症反应是真菌清除所必需的。然而,如果不加控制,过度的宿主炎症反应也会进一步导致病理组织损伤。因此,在眼部免疫防御中精确平衡促炎和抗炎反应十分重要。丁香

酚的抗炎作用已被广泛研究。已证实,丁香酚可通过降低炎症反应改善特定器官的功能^[19]。在金黄色葡萄球菌感染的大鼠中,丁香酚除发挥抗菌作用外,还可通过增加毛细血管数量、减少炎症细胞来促进伤口愈合^[20]。本研究发现,在镰刀菌感染第3d小鼠角膜IL-6显著升高。同时,丁香酚组小鼠在感染前期IL-6表达水平明显高于DMSO组,而感染后期IL-6表达明显低于DMSO组。此外,丁香酚组感染前期与后期IL-1β表达均明显低于DMSO组。作为重要的促炎细胞因子,IL-1β和IL-6通过激活多种反应,在宿主抵抗病原微生物的过程中发挥重要作用。IL-1β是由免疫细胞产生的Th1型细胞因子,其主要功能是增强炎症反应^[21]。IL-6是急性期反应的强诱导物,能参与促进炎症反应的恢复。IL-6的表达是小鼠FK中机体重要的防御和保护因素^[22]。基于这些结果推测,在镰刀菌感染急性期,丁香酚能够促进IL-6介导的急性期炎症反应,从而有助于真菌的早期清除;同时,通过抑制IL-1β介导的炎症反应,减轻感染后期的病理损害。因此,除抗菌作用外,丁香酚能够通过调节炎症因子分泌改善镰刀菌感染引起的角膜炎。

PI3K/AKT信号通路作为目前研究最广泛的典型信号通路之一,已被证实参与调控细胞凋亡、转录、翻译、新陈代谢和细胞周期等多种细胞生物学过程。在炎症性疾病中,PI3K/AKT信号通路会被异常激活,而且该通路的异常激活与炎症的发生和发展密切相关^[23]。近年来的研究表明,PI3K/AKT信号通路与不同微生物的感染和发病机制有关,并对各种角膜疾病产生重要影响。值得注意的是,Yeh等^[24]证实,PI3K/AKT信号通路在镰刀菌感染的FK小鼠体内被激活,这与本研究中的结果一致。在细菌性角膜炎中,通过调控PI3K/AKT通路产生的免疫调节作用可抑制炎症并延缓角膜炎的进展^[25-26]。在单纯疱疹病毒感染后的角膜组织中,p-PI3K和p-AKT明显增加,提示这一信号通路可能参与介导角膜炎的发生进展^[27]。在FK中,假交替单胞菌胞外多糖EPS-II能够抑制白色念珠菌对角膜上皮细胞的黏附,这可能是通过抑制PI3K/AKT

信号传导以降低了相关炎症因子的水平来实现^[28]。这些结果提示,PI3K/AKT 信号通路在 FK 免疫调节中起着至关重要的作用,靶向 PI3K/AKT 通路可能成为 FK 的潜在治疗靶点。本研究发现,丁香酚能够降低 PI3K 和 AKT 的磷酸化水平,提示丁香酚能够抑制 PI3K/AKT 信号通路激活。为进一步确定丁香酚在 FK 小鼠中的作用机制,本研究也使用了 PI3K/AKT 通路激活剂 IGF-1 进行挽救实验。与预期一致,本研究发现,IGF-1 可在一定程度上消除丁香酚对 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用。同时,丁香酚对 FK 小鼠角膜组织损伤的改善及促炎细胞因子分泌的抑制作用均能够被 IGF-1 所逆转。这些结果证实丁香酚可能通过抑制 PI3K/AKT 通路的活化来发挥抗炎效应,从而促进角膜抗真菌过程中的先天免疫,加速 FK 愈合,在 FK 小鼠中发挥保护作用。

然而,本研究仍存在一些不足:(1)丁香酚应用在眼部的生物利用度仍需要探讨。(2)本研究未对全身免疫程度进行评估,针对 FK 选择合适的治疗时机还有赖于机体免疫状态、感染严重程度、开始用药时间等,如何合理把握给药时机、剂量仍有待进一步研究。(3)本研究仅以 PI3K/AKT 信号通路为切入点,并以丁香酚联合应用激活剂进行挽救实验,确定丁香酚能够抑制 PI3K/AKT 信号通路活化。未来有必要以 PI3K/AKT 信号通路抑制剂作为阳性对照,或者选择更多信号通路进行深入研究。(4)丁香酚的治疗效果是否与不同的真菌菌株种类有关仍有待进一步探索。

综上所述,丁香酚通过抑制 PI3K/AKT 通路来减轻镰刀菌引起的角膜炎症,从而提高小鼠对病原微生物的抵抗力。

参考文献

[1] 周晓丹, 杨玉倩, 徐强崧. 真菌性角膜炎的致病菌属和转归及其影响因素分析. 国际眼科杂志, 2022, 22(11): 1892-1895.

[2] 黄光怡, 唐宁宇, 陈琦, 等. 基于迁移学习和数据增强策略构建真菌性角膜炎镰刀菌属鉴定的智能诊断系统. 国际眼科杂志, 2022, 22(5): 736-740.

[3] Ghafouri-Fard S, Khanbabapour Sasi A, Hussen BM, et al. Interplay between PI3K/AKT pathway and heart disorders. Mol Biol Rep, 2022, 49(10): 9767-9781.

[4] Lv J, Gao R, Wang Y, et al. Protective effect of leukemia inhibitory factor on the retinal injury induced by acute ocular hypertension in rats. Exp Ther Med, 2023, 25(1): 19.

[5] Didehdar M, Chegini Z, Shariati A. Eugenol: a novel therapeutic agent for the inhibition of Candida species infection. Front Pharmacol, 2022, 13: 872127.

[6] Ulanowska M, Olas B. Biological properties and prospects for the application of eugenol—a review. Int J Mol Sci, 2021, 22(7): 3671.

[7] Yu B, Li C, Gu LW, et al. Eugenol protects against Aspergillus fumigatus keratitis by inhibiting inflammatory response and reducing fungal load. Eur J Pharmacol, 2022, 924: 174955.

[8] Zhu Y, Peng X, Zhang Y, et al. Baicalein protects against Aspergillus fumigatus keratitis by reducing fungal load and inhibiting TSLP-induced inflammatory response. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2021, 62(6): 26.

[9] Wang M, Tang W, Xiang L, et al. Involvement of MdWRKY40 in the defense of mycorrhizal apple against fusarium solani. BMC Plant Biol, 2022, 22(1): 385.

[10] Vidya Raj CK, Venugopal J, Muthaiah M, et al. *In-vitro* anti-Mycobacterium tuberculosis effect of Eugenol. Indian J Tuberc, 2022, 69(4): 647-654.

[11] Padhy I, Paul P, Sharma T, et al. Molecular mechanisms of action of eugenol in cancer: recent trends and advancement. Life (Basel), 2022, 12(11): 1795.

[12] Oliveira LM, Siqueira FS, Silva MT, et al. Synthesis and antimicrobial activity of molecular hybrids based on eugenol and chloramphenicol pharmacophores. Folia Microbiol, 2023, 68(6): 823-833.

[13] Boonchird C, Flegel TW. *In vitro* antifungal activity of eugenol and vanillin against Candida albicans and Cryptococcus neoformans. Can J Microbiol, 1982, 28(11): 1235-1241.

[14] Prajapati J, Goswami D, Dabhi M, et al. Potential dual inhibition of SE and CYP51 by eugenol conferring inhibition of Candida albicans: Computationally curated study with experimental validation. Comput Biol Med, 2022, 151: 106237.

[15] Shahina Z, Ndlovu E, Persaud O, et al. Candida albicans reactive oxygen species (ROS) - dependent lethality and ROS - independent hyphal and biofilm inhibition by eugenol and citral. Microbiol Spectr, 2022, 10(6): e0318322.

[16] Chami N, Chami F, Bennis S, et al. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. Braz J Infect Dis, 2004, 8(3): 217-226.

[17] León B. Fooling TLR4 to promote fungal virulence. Immunity, 2022, 55(9): 1591-1593.

[18] Dang EV, Lei SS, Radkov A, et al. Secreted fungal virulence effector triggers allergic inflammation via TLR4. Nature, 2022, 608(7921): 161-167.

[19] Liu W, Chen G, Dou KK, et al. Eugenol eliminates carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae via reactive oxygen species mechanism. Front Microbiol, 2023, 14: 1090787.

[20] Alanazi AK, Alqasbi MH, Alrouji M, et al. Antibacterial Activity of Syzygium aromaticum (Clove) Bud Oil and Its Interaction with Imipenem in Controlling Wound Infections in Rats Caused by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Molecules, 2022, 27(23): 8551.

[21] Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22(4): 189-195.

[22] 银红梅, 钟文贤, 谢立信. 真菌性小鼠角膜炎中炎症因子的表达. 中华眼科杂志, 2010, 46(9): 821-828.

[23] Acosta-Martinez M, Cabail MZ. The PI3K/Akt pathway in meta-inflammation. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 15330.

[24] Yeh CC, Horng HC, Chou H, et al. Dectin-1-mediated pathway contributes to Fusarium proliferatum-induced CXCL-8 release from human respiratory epithelial cells. Int J Mol Sci, 2017, 18(3): E624.

[25] Huang L, Tang H, Hu J. METTL3 attenuates inflammation in Fusarium solani-induced keratitis via the PI3K/AKT signaling pathway. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2022, 63(10): 20.

[26] Yuan KL, Zheng J, Shen X, et al. Sensory nerves promote corneal inflammation resolution via CGRP mediated transformation of macrophages to the M2 phenotype through the PI3K/AKT signaling pathway. Int Immunopharmacol, 2022, 102: 108426.

[27] Ke L, Yang Y, Li JW, et al. Modulation of corneal FAK/PI3K/Akt signaling expression and of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 during the development of herpes simplex keratitis. Biomed Res Int, 2019, 2019: 4143981.

[28] Chen H, Zheng Z, Chen P, et al. Inhibitory Effect of Extracellular Polysaccharide EPS-II from Pseudoalteromonas on Candida adhesion to Cornea *in vitro*. Biomed Environ Sci, 2012, 25(2): 210-215.