

· 实验研究 ·

腐皮镰孢菌对角膜上皮细胞 AMPK 磷酸化及 IL-6 表达的影响

魏静静 谢艳亭 岳娟 董军璐 司玮 王春梅 张红敏 王丽娅

郑州大学人民医院 河南省人民医院眼科 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所 河南省眼科与视觉科学重点实验室, 郑州 450003

通信作者: 张红敏, Email: zhm0906@163.com

【摘要】 目的 研究角膜上皮细胞是否存在腺嘌呤核糖核苷酸活化的蛋白激酶 (AMPK) 磷酸化及真菌对角膜上皮细胞 AMPK 磷酸化和白细胞介素 6 (IL-6) 表达的影响。 **方法** 取人永生角膜上皮细胞系, 采用实时无标记细胞多功能分析仪筛选 AMPK 激动剂 5-氨基-4-甲酰胺咪唑核糖核苷酸 (AICAR) (100, 300, 500 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$) 和抑制剂化合物 C (10.0, 12.5, 15.0, 17.5 和 20.0 $\mu\text{mol/L}$) 对角膜上皮细胞作用的安全浓度范围。以单纯角膜上皮细胞作为正常对照组, 角膜上皮细胞与孢子共培养作为孢子对照组, 在孢子对照组基础上分别加入 AICAR 和化合物 C 作为 AICAR 组和化合物 C 组, 分别培养 4 h。采用 Western blot 法检测角膜上皮细胞磷酸化 AMPK (p-AMPK) 和 AMPK 的表达, 采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法测定角膜上皮细胞培养上清液中 IL-6 质量浓度。 **结果** 不同浓度 AICAR 作用于角膜上皮细胞不同时间后, 细胞指数总体比较差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。10.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 C 作用于角膜上皮细胞后细胞指数较未处理细胞升高。正常对照组、孢子对照组、AICAR 组和化合物 C 组 p-AMPK 水平分别为 0.67 ± 0.15 、 2.57 ± 0.12 、 3.67 ± 0.58 和 1.50 ± 0.50 , 各组间总体比较差异有统计学意义 ($F=32.820, P<0.001$)。孢子对照组 p-AMPK 水平较正常对照组升高, 差异有统计学意义 ($P<0.001$); AICAR 组较孢子对照组 p-AMPK 水平升高, 化合物 C 组较孢子对照组 p-AMPK 水平降低, 差异均有统计学意义 (均 $P=0.010$)。正常对照组、孢子对照组、AICAR 组和化合物 C 组 AMPK 相对表达量总体比较差异无统计学意义 ($F=0.120, P=0.950$)。正常对照组、孢子对照组、AICAR 组和化合物 C 组 IL-6 质量浓度分别为 (107.81 ± 17.15)、(156.32 ± 9.94)、(167.96 ± 14.16) 和 (127.42 ± 19.75) pg/ml , 各组间总体比较差异有统计学意义 ($F=15.210, P<0.001$), 其中孢子对照组 IL-6 质量浓度较正常对照组升高, 差异有统计学意义 ($P<0.001$); AICAR 组 IL-6 质量浓度较孢子对照组略升高, 差异无统计学意义 ($P=0.260$), 化合物 C 组 IL-6 质量浓度较孢子对照组降低, 差异有统计学意义 ($P=0.010$)。 **结论** 角膜上皮细胞有 AMPK 磷酸化表达, 且真菌孢子刺激角膜上皮细胞后 AMPK 磷酸化增强, IL-6 分泌增多。

【关键词】 真菌; 角膜炎; 上皮细胞; 白细胞介素 6; 腺嘌呤核糖核苷酸活化的蛋白激酶; 磷酸化**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目 (81770902); 国家自然科学基金河南联合基金重点支持项目 (U1704283); 河南省立眼科医院基础研究重点专项项目 (21JCZD003)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200730-00544

Effects of *Fusarium solani* on AMPK phosphorylation and IL-6 expression in corneal epithelial cells

Wei Jingjing, Xie Yanting, Yue Juan, Dong Junlu, Si Wei, Wang Chunmei, Zhang Hongmin, Wang Liya

People's Hospital of Zhengzhou University, Department of Ophthalmology, Henan Provincial People's Hospital, Henan Eye Hospital, Henan Eye Institute, Henan Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Zhang Hongmin, Email: zhm0906@163.com

[Abstract] Objective To investigate the expression of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation in corneal epithelial cells and the effects of fungus on AMPK phosphorylation and interleukin-6 (IL-6) production in corneal epithelial cells. **Methods** The human immortalized corneal epithelial cell line was selected. The safe concentration range of AMPK agonist 5-aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside (AICAR) (100, 300, 500, 1 000 $\mu\text{mol/L}$) and inhibitor Compound C (10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0 $\mu\text{mol/L}$) on corneal epithelial cells was screened by multi-function real-time unlabeled cell analyzer. Corneal epithelial cells without any treatment were used as the normal control group, and those co-cultured with spores were

used as the spore control group. Corneal epithelial cells co-cultured with spores were treated with AICAR and Compound C for 4 hours in the AICAR group and Compound C group, respectively. The expression of phosphorylated AMPK (p-AMPK) and AMPK in corneal epithelial cells was detected by Western blot, and the concentration of IL-6 in the culture supernatant was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** After treatment with different concentrations of AICAR for different periods, there was no statistical significance in the cell index of corneal epithelial cells (all at $P > 0.05$). The cell index of corneal epithelial cells was increased with 10.0 $\mu\text{mol/L}$ and 12.5 $\mu\text{mol/L}$ Compound C treatment compared with that of the normal control group. The expression levels of p-AMPK were 0.67 ± 0.15 , 2.57 ± 0.12 , 3.67 ± 0.58 and 1.50 ± 0.50 , respectively, in the normal control group, spore control group, AICAR group and Compound C group, showing a statistically significant difference among them ($F = 32.820, P < 0.001$). The expression level of p-AMPK was significantly higher in the spore control group compared with the normal control group ($P < 0.001$). The expression level of p-AMPK in the AICAR group was higher than that in the spore control group, and the expression level of p-AMPK in the Compound C group was lower than that in the spore control group, and the differences were statistically significant (both at $P = 0.010$). There was no significant difference in the relative expression level of AMPK among the four groups ($F = 0.120, P = 0.950$). The expression levels of IL-6 concentration in the normal control group, spore control group, AICAR group and Compound C group were (107.81 ± 17.15), (156.32 ± 9.94), (167.96 ± 14.16) and (127.42 ± 19.75) pg/ml, respectively, showing a statistically significant difference among them ($F = 15.210, P < 0.001$). The IL-6 concentration of the spore control group was higher than that of the normal control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). The IL-6 concentration of the AICAR group was higher than that of the spore control group, but the difference was not statistically significant ($P = 0.260$). The IL-6 concentration of the Compound C group was lower than that of the spore control group, and the difference was statistically significant ($P = 0.010$). **Conclusions** In corneal epithelial cells, AMPK phosphorylation is found, which is enhanced after fungal spores stimulation, and the secretion of IL-6 increases.

[Key words] Fungi; Keratitis; Epithelial cells; Interleukin-6; Adenine ribonucleotide activated protein kinase; Phosphorylation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81770902); National Natural Science Foundation of Henan Joint Fund Key Support Project (U1704283); Basic Research Project of Henan Provincial Eye Hospital (21JCZD003)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200730-00544

腺嘌呤核糖核苷酸活化的蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 是一种由 α 、 β 和 γ 亚基组成的异源三聚体蛋白激酶, 参与调节葡萄糖、脂质以及蛋白质的代谢和维持能量稳态, 被称为细胞能量调节器^[1-2]。近年来研究发现, AMPK 信号通路除在能量代谢调节方面起关键作用外, 在感染和宿主防御方面也起到重要作用^[3-4]。真菌性角膜炎是由致病真菌引起的严重感染性、致盲眼病, 临床抗真菌类滴眼剂种类有限, 治疗棘手^[5-6]。位于角膜组织最外层的上皮细胞是角膜防御致病微生物侵袭的第一道屏障, 是防御真菌感染的关键, 目前角膜上皮细胞是否存在 AMPK 磷酸化尚不清楚。在真菌性角膜炎炎症初期及进展期, 大量多形核中性粒细胞浸润^[7], 白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 是一种由 184 个氨基酸组成的单链糖蛋白^[8], 其能促进多形核中性粒细胞的激活^[9]。IL-6 以自分泌-旁分泌的方式起作用, 诱导驻留的角膜细胞产生巨噬细胞炎症蛋白 (macrophage inflammatory protein, MIP)-2 和 MIP-1 α ^[10],

MIP 能促进角膜局部炎症免疫细胞聚集, 从而发挥杀菌作用。本实验拟研究角膜上皮细胞是否存在 AMPK 磷酸化以及真菌对角膜上皮细胞 AMPK 磷酸化及 IL-6 表达的影响, 探讨 AMPK 磷酸化和 IL-6 在真菌性角膜炎中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和菌株来源 人永生化角膜上皮细胞系 CRL-11135 HCE-2(50. B1) (美国 ATCC 公司)。腐皮镰孢菌 (编号: 3.5840) (中国科学院微生物研究所)。

1.1.2 主要试剂及仪器 上样缓冲液 SDS-PAGE (CW0028A, 北京康为世纪生物科技有限公司); PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (PG113, 上海雅酶生物医药科技有限公司); 预染蛋白 marker (#26616, 美国 Thermo 公司); 发光底物 HRP (ECL 发光液) (WBKLS0100)、PVDF 膜 (IPVH00010) (美国 Millipore 公司); 磷酸酶抑制剂 Cocktail II (HY-K0022)、蛋白酶抑制剂 (HY-

K0011)、AMPK 磷酸化激动剂 5-氨基-4-甲酰胺咪唑核糖核苷酸 (5-aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside, AICAR) (HY13417)、AMPK 磷酸化抑制剂化合物 C (HY-13418) (美国 MCE 公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (PC0020)、RIPA 裂解液 (#R0010) (北京索莱宝科技有限公司); IL-6 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂 (E-EL-H0102c)、 β -actin (武汉伊莱瑞特生物科技有限公司); 磷酸化 AMPK (p-AMPK) α 1 (Thr172) (40H9) 兔单克隆抗体 (#2535S)、AMPK α (D5A2) 兔单克隆抗体 (#5831S) (美国 CST 公司); HRP 标记山羊抗兔 (111-035-003, 美国 Jackson 公司)。实时无标记细胞多功能分析仪 (xCELLigence RTCA S16, 杭州艾森生物有限公司); 多功能酶标仪 (美国 PerkinElmer 公司); 蛋白电泳仪、化学发光仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实时无标记细胞多功能分析仪筛选 AICAR 和化合物 C 安全浓度 复苏人永生化角膜上皮细胞, 待生长状态良好后给予传代, 在 E-Plate 16 孔板中加入 50 μ l 培养基, 置于 RTCA Station 完成基线测定, 并确定所选择的孔接触正常, 向每孔加入含 2.0×10^4 个细胞的细胞悬液, 每个浓度设置 3 个复孔, 培养 12 h, 使细胞充分贴壁, 待培养至对数生长期时, 向每孔中分别加入浓度梯度为 100、300、500 和 1 000 μ mol/L 的 AICAR 以及浓度梯度为 10.0、12.5、15.0、17.5 和 20.0 μ mol/L 的化合物 C, 以未处理细胞作为对照, 加药结束后设置对应孔的药物名称和药物浓度及相关参数, 将实时无标记细胞多功能分析仪放入 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO_2 、95% 湿度的细胞培养箱中, 培养至平台期, 观察角膜上皮细胞生长指数, 确定药物对角膜上皮细胞作用的安全浓度范围。实验重复 4 次, 取平均值。

1.2.2 细胞分组及处理 将角膜上皮细胞分为正常对照组、孢子对照组、AICAR 组和化合物 C 组, 以单纯角膜上皮细胞作为正常对照组, 角膜上皮细胞与孢子共培养作为孢子对照组, 在孢子对照组基础上分别加入 AICAR 和化合物 C 作为 AICAR 组和化合物 C 组。以每孔 5.0×10^6 个细胞铺板, 按孢子与角膜上皮细胞数量比为 1:1 的比例, 将孢子加入到含细胞的孔板中混匀, 每组均设 3 个复孔, 按照对应的分组加入 AICAR 和化合物 C, 根据 AICAR、化合物 C 对角膜上皮细胞作用的安全浓度范围, 选取 AICAR 和化合物 C 的终浓度分别为 1 000 μ mol/L 和 10.0 μ mol/L, 放入细胞培养箱中培养 4 h, 备用。本课题组前期预实验结

果显示, 角膜上皮细胞与孢子共培养 4 h 时角膜上皮细胞 AMPK 磷酸化的刺激作用最强, 故本实验中选择 4 h 为培养时间。

1.2.3 Western blot 法检测 p-AMPK 和 AMPK 蛋白在角膜上皮细胞中的表达 培养结束后收集细胞, 用 RIPA 裂解液 (预先加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂) 冰上裂解细胞提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 按照说明配制质量分数 12.5% SDS-PAGE 凝胶, 110 V 恒压电泳 1 h, 湿转法 120 V 恒压转膜 1 h 至 PVDF 膜。采用质量分数 5% 牛血清白蛋白溶液室温封闭 1 h, 去除封闭液, 分别浸入 p-AMPK α 1 (Thr172) 兔单克隆抗体 (1:200) 和 AMPK α 兔单克隆抗体 (1:1 000) 中, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 复温后用含 Tween 20 的磷酸盐缓冲液洗膜 3 次; 浸入 HRP 标记山羊抗兔 IgG (1:1 000) 室温孵育 1 h, 洗膜后加入 ECL 液用化学发光仪进行显影, 以 β -actin 为内参。采用 ImageJ 分析软件测定条带灰度值, 目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值/ β -actin 条带灰度值。实验重复 4 次, 取平均值。

1.2.4 ELISA 法测定角膜上皮细胞上清液中 IL-6 质量浓度 各组培养 4 h 后收集细胞培养上清液, 按照试剂盒说明书进行如下操作: 将标准品倍比稀释后依次加入到酶标板孔内, 每孔 100 μ l, 均设 3 个复孔; 于其他孔中加入 100 μ l 待测样品细胞上清原液, 给予酶标板覆膜, 37 $^{\circ}$ C 孵育 90 min。倒去孔内液体, 加入 100 μ l 生物素化抗体工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。向每孔加入 350 μ l 洗涤液, 洗涤 3 次。加入 100 μ l 酶结合物工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。进行 5 次洗涤, 加入 90 μ l 底物溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 加入 50 μ l 终止液, 立即用酶标仪测定波长 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 用 A_{540} 值进行校正, 绘制标准曲线, 得到公式后代入数据计算 IL-6 的质量浓度。实验重复 4 次, 取平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析, 计量资料的数据经 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间数据总体比较采用单因素方差分析, 若方差齐, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 若方差不齐, 组间两两比较采用 Tamhane T2 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AMPK 激动剂 AICAR 对角膜上皮细胞作用的安全浓度范围

不同浓度 AICAR 作用于角膜上皮细胞不同时间

后,细胞指数总体比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表 1),表明 AICAR 安全范围较广,在 100 ~ 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 均无角膜上皮细胞毒性作用。前期预实验结果显示,1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 AICAR 对角膜上皮细胞 AMPK 磷酸化的刺激作用最强,因此,选择 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 作为 AICAR 后续实验的终浓度。

2.2 AMPK 抑制剂化合物 C 对角膜上皮细胞作用的安全浓度范围

不同浓度化合物 C 作用于角膜上皮细胞后 24、36、48、60 和 72 h,细胞指数总体比较差异均有统计学意义($F = 24.106, 61.937, 125.858, 378.399, 229.704$, 均 $P < 0.001$),其中 17.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 20.0 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 C 作用后 24 h 细胞指数均低于对照组,15.0、17.5 和 20.0 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 C 作用后 36、48、60 和 72 h 细胞指数均低于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(表 2),表明 10.0 ~ 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 C 对角膜上皮细胞无毒性作用。前期预实验结果显示,10.0 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 C 对角膜上皮细胞 AMPK 磷酸化表达即有较好的抑制作用,因此,选择 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 作为化合物 C 后续实验的终浓度。

2.3 真菌孢子对角膜上皮细胞 AMPK 磷酸化的影响

Western blot 检测结果显示,与正常对照组比较,孢子对照组和 AICAR 组 p-AMPK 蛋白表达条带增强,化合物 C 组 p-AMPK 蛋白表达条带减弱;各组 AMPK 蛋白表达条带无明显变化(图 1A)。正常对照组、孢子对照组、AICAR 组和化合物 C 组 p-AMPK 相对表达量分别为 0.67 ± 0.15 、 2.57 ± 0.12 、 3.67 ± 0.58 和 1.50 ± 0.50 ,各组间总体比较差异有统计学意义($F = 32.820$, $P < 0.001$),其中孢子对照组 p-AMPK 相对表达量较正常对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.001$);AICAR 组较孢子对照组 p-AMPK 相对表达量明显升高,化合物 C 组较孢子对照组 p-AMPK 相对表达量明显降低,差异均有统计学意义(均 $P =$

0.010)(图 1B)。正常对照组、孢子对照组、AICAR 组和化合物 C 组 AMPK 相对表达量分别为 1.09 ± 0.74 、 1.47 ± 0.78 、 1.45 ± 0.96 和 1.29 ± 1.04 ,各组总体比较差异无统计学意义($F = 0.120$, $P = 0.950$)(图 1C)。

2.4 真菌孢子对角膜上皮细胞培养上清液中 IL-6 表达的影响

ELISA 法测定结果显示,正常对照组、孢子对照组、AICAR 组和化合物 C 组 IL-6 质量浓度分别为 (107.81 ± 17.15)、(156.32 ± 9.94)、(167.96 ± 14.16) 和 (127.42 ± 19.75) pg/ml ,各组间总体比较差异有统计学意义($F = 15.210$, $P < 0.001$),其中孢子对照组 IL-6 质量浓度较正常对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.001$);AICAR 组 IL-6 质量浓度较孢子对照组略升高,差异无统计学意义($P = 0.260$),化合物 C 组 IL-6 质量浓度较孢子对照组明显降低,差异有统计学意义($P = 0.010$)(图 2)。

表 1 不同浓度 AICAR 作用于角膜上皮细胞不同时间后细胞指数比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of cell index of AICAR-treated corneal epithelial cells at various time points among different concentrations of AICAR ($\bar{x} \pm s$)

AICAR 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	样本量	细胞指数					
		12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
0	4	1.02 ± 0.14	2.67 ± 0.05	3.95 ± 0.17	4.84 ± 0.02	4.76 ± 0.22	4.90 ± 0.16
100	4	0.99 ± 0.13	2.51 ± 0.16	3.70 ± 0.17	4.37 ± 0.26	4.47 ± 0.43	4.58 ± 0.50
300	4	1.05 ± 0.11	2.51 ± 0.18	3.66 ± 0.63	4.34 ± 0.62	4.42 ± 0.79	4.55 ± 0.62
500	4	0.96 ± 0.14	2.58 ± 0.03	4.02 ± 0.46	4.79 ± 0.34	4.83 ± 0.66	4.89 ± 0.64
1 000	4	0.96 ± 0.19	2.44 ± 0.15	3.92 ± 0.25	4.85 ± 0.31	4.89 ± 0.45	4.98 ± 0.55
F 值		0.203	1.283	0.531	1.496	0.472	0.438
P 值		0.931	0.340	0.716	0.275	0.756	0.779

注:(单因素方差分析) AICAR:5-氨基-4-甲酰胺咪唑核苷核苷酸
Note:(One-way ANOVA) AICAR:5-aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside

表 2 不同浓度化合物 C 作用于角膜上皮细胞不同时间后细胞指数比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of cell index of Compound C-treated corneal epithelial cells at various time points among different concentrations of Compound C ($\bar{x} \pm s$)

化合物 C 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	样本量	细胞指数					
		12 h	24 h ^a	36 h ^a	48 h ^a	60 h ^a	72 h ^a
0	4	1.00 ± 0.12	2.66 ± 0.05	3.69 ± 0.55	4.88 ± 0.07	4.83 ± 0.17	4.92 ± 0.15
10.0	4	1.21 ± 0.46	2.71 ± 0.19	4.08 ± 0.34	4.81 ± 0.22	4.94 ± 0.39	5.02 ± 0.29
12.5	4	1.19 ± 0.30	2.39 ± 0.36	3.88 ± 0.46	4.77 ± 0.27	5.40 ± 0.05	5.46 ± 0.04
15.0	4	1.41 ± 1.03	1.77 ± 0.86	1.76 ± 0.55^a	1.77 ± 0.58^a	1.29 ± 0.34^a	1.04 ± 0.43^a
17.5	4	0.48 ± 0.11	0.42 ± 0.12^a	0.18 ± 0.11^a	0.29 ± 0.28^a	0.10 ± 0.01^a	0.07 ± 0.00^a
20.0	4	0.39 ± 0.23	0.22 ± 0.13^a	0.25 ± 0.14^a	0.38 ± 0.44^a	0.12 ± 0.08^a	0.37 ± 0.47^a
F 值		2.178	24.106	61.937	125.858	378.399	229.704
P 值		0.125	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与各自对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)比较,^a $P < 0.01$ (单因素方差分析,#:Tamhane T2 检验;* :LSD-t 检验)

Note:Compared with the respective control group (0 $\mu\text{mol/L}$),^a $P < 0.01$ (One-way ANOVA, #:Tamhane T2 test; * :LSD-t test)

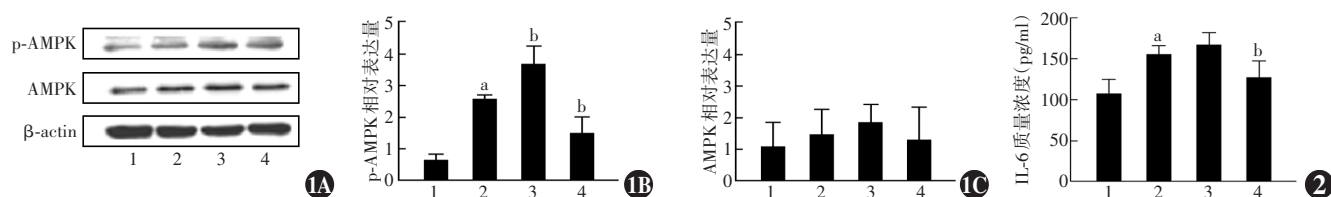


图 1 真菌孢子诱导的角膜上皮细胞 p-AMPK 和 AMPK 蛋白表达 A: Western blot 法检测电泳图 B: 各组角膜上皮细胞中 p-AMPK 蛋白定量结果比较 $F=32.820, P<0.001$. 与正常对照组比较, ^a $P<0.01$; 与孢子对照组比较, ^b $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=4$) C: 各组角膜上皮细胞中 AMPK 蛋白定量结果比较 $F=0.120, P=0.950$ (单因素方差分析, $n=4$) 1: 正常对照组; 2: 孢子对照组; 3: AICAR 组; 4: 化合物 C 组 p-AMPK: 磷酸化腺苷酸激活蛋白激酶; AMPK: 腺嘌呤核糖核苷酸活化的蛋白激酶; β -actin: β -肌动蛋白 **图 2 各组角膜上皮细胞培养上清液中 IL-6 质量浓度比较** $F=15.210, P<0.001$. 与正常对照组比较, ^a $P<0.01$; 与孢子对照组比较, ^b $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=4$) 1: 正常对照组; 2: 孢子对照组; 3: AICAR 组; 4: 化合物 C 组 IL: 白细胞介素

Figure 1 Expression of p-AMPK and AMPK proteins in corneal epithelial cells induced by fungal spores A: Electrophoretogram of p-AMPK and AMPK proteins by Western blot B: Comparison of quantitative results of p-AMPK protein in corneal epithelial cells among different groups $F=32.820, P<0.001$ Compared with the normal control group, ^a $P<0.01$; compared with the spore control group, ^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n=4$) C: Comparison of quantitative results of AMPK protein in corneal epithelial cells among different groups $F=0.120, P=0.950$ (One-way ANOVA, $n=4$) 1: Normal control group; 2: Spore control group; 3: AICAR group; 4: Compound C group p-AMPK: phosphorylated adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase; AMPK: adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase **Figure 2 Comparison of IL-6 concentration in culture supernatant among different groups** $F=15.210, P<0.001$ Compared with the normal control group, ^a $P<0.01$; compared with the spore control group, ^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n=4$) 1: Normal control group; 2: Spore control group; 3: AICAR group; 4: Compound C group IL: interleukin

3 讨论

角膜上皮细胞是上皮类细胞的一种, AMPK 磷酸化在上皮类细胞中广泛表达, 如肺泡上皮 A549 细胞、视网膜色素上皮细胞和唾液腺上皮细胞等^[11-13]。本研究结果显示, 角膜上皮细胞中存在 AMPK 磷酸化, 在真菌诱导的角膜上皮细胞中 AMPK 磷酸化水平升高, 且 AICAR 可以增强这一效应, 化合物 C 则抑制这一效应。宿主对隐球菌(一种致命的真菌病原体)感染的反应进行全面的磷酸化蛋白质组学分析结果显示, 真菌被巨噬细胞摄取后, 大量不同的宿主蛋白被差异磷酸化, 包括 AMPK α ^[14], 与本研究结果相似, 提示 AMPK 磷酸化参与真菌性角膜炎的致病过程。不仅如此, AMPK 磷酸化在细菌、病毒和寄生虫等感染性疾病中亦有重要意义^[15-17]。目前, 关于 AMPK 磷酸化在真菌诱导感染性疾病中的研究仍较少, 未来可深入研究 AMPK 磷酸化在真菌感染中的作用机制, 寻找致病靶点, 为开发更多的抗真菌药物提供基础。

本研究发现真菌诱导的角膜上皮细胞培养上清液中 IL-6 的质量浓度升高, 与既往研究结果相似。灭活的茄病镰刀菌孢子在体外能上调人角膜上皮细胞中核苷酸结合寡聚化结构域蛋白 2 mRNA 及蛋白的表达, 并促进下游炎症因子 IL-6、IL-8 和肿瘤坏死因子 α 蛋白的表达^[18]; 巴西假单胞菌以蛋白激酶 C 依赖性方式促进人肺上皮 A549 细胞分泌 IL-6 和 IL-8^[19]; 该结果在体内实验中亦得到证实。IL-6 在烟曲霉性角膜炎大鼠角膜中早期大量表达, 中晚期达高峰^[20], 黑曲霉

刺激增加慢性鼻-鼻窦炎鼻息肉组织中促炎细胞因子 IL-6 的表达^[21]。真菌性角膜炎的免疫反应过程中, 病变早期主要是中性粒细胞发挥关键作用^[22], IL-6 则能促进小鼠角膜上皮损伤的快速修复, 同时伴有角膜中的中性粒细胞和巨噬细胞表达增多^[23]。因此, IL-6 表达的增加在真菌性角膜感染中是一种保护因素。

本研究发现, 真菌刺激角膜上皮细胞后, p-AMPK 表达水平和分泌的 IL-6 质量浓度均升高; 在孢子刺激的基础上加入 AICAR, p-AMPK 表达水平和 IL-6 质量浓度也升高, 但与孢子对照组比较差异无统计学意义, 猜测可能是孢子刺激引起角膜上皮细胞培养上清液中的 IL-6 质量浓度已达到高峰, 接近饱和状态, 故加入 AICAR 后 IL-6 的质量浓度升高幅度不明显; 在孢子刺激的基础上加入化合物 C 作用后, p-AMPK 表达水平降低, IL-6 的表达亦减少, 证明角膜上皮细胞 AMPK 磷酸化与 IL-6 的分泌有关。

大量研究显示, 核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是炎症产生的关键因子, IL-6 是激活 NF- κ B 信号传导的刺激因子和激活产物^[24-25]。本研究推测, 角膜上皮细胞在真菌刺激下激活 AMPK, 通过 NF- κ B 正反馈调节引起炎症级联反应, 以募集中性粒细胞到感染部位。本研究仅对角膜上皮细胞在真菌刺激下 AMPK 的激活以及产生的 IL-6 进行了体外研究, 并未对磷酸化 AMPK 促进 IL-6 产生的机制进行探讨, 关于真菌刺激角膜上皮细胞激活 AMPK-NF- κ B-IL-6 通路的假说仍有待进一步的实验验证。

综上所述, 本研究发现角膜上皮细胞中存在

AMPK 磷酸化,在真菌孢子诱导下,角膜上皮细胞 AMPK 磷酸化增强,IL-6 分泌增多,从而促进炎症反应,有利于免疫细胞向感染部位募集,对真菌的彻底清除具有一定的意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

作者贡献声明 魏静静:设计实验、实验操作、论文撰写、数据整理、统计分析;谢艳亭、岳娟、董军璐、司玮、王春梅:实验操作、数据分析;张红敏:设计实验、研究指导、论文修改、经费支持;王丽娅:论文修改,研究指导

参考文献

- [1] Lyons CL, Roche HM. Nutritional modulation of AMPK-impact upon metabolic-inflammation[J/OL]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 3092 [2021-05-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30304866/>. DOI: 10.3390/ijms19103092.
- [2] Ross FA, MacKintosh C, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours[J]. FEBS J, 2016, 283(16): 2987-3001. DOI: 10.1111/febs.13698.
- [3] Xiang HC, Lin LX, Hu XF, et al. AMPK activation attenuates inflammatory pain through inhibiting NF- κ B activation and IL-1 β expression[J/OL]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 34 [2021-05-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30755236/>. DOI: 10.1186/s12974-019-1411-x.
- [4] Liong S, Lappas M. Activation of AMPK improves inflammation and insulin resistance in adipose tissue and skeletal muscle from pregnant women[J]. J Physiol Biochem, 2015, 71(4): 703-717. DOI: 10.1007/s13105-015-0435-7.
- [5] Bongomin F, Gago S, Oladele RO, et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision[J/OL]. J Fungi (Basel), 2017, 3(4): 57 [2021-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29371573/>. DOI: 10.3390/jof3040057.
- [6] 李青,赵桂秋,林静,等.角膜溃疡清创联合羊膜覆盖术及药物治疗真菌性角膜炎的临床疗效[J].中华实验眼科杂志,2014,32(9): 824-828. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.09.012.
- [7] Li Q, Zhao GQ, Lin J, et al. Clinical efficacy of the combination of lesion debridement with amniotic membrane cover and drugs for fungal keratitis[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(9): 824-828. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.09.012.
- [8] Leal SM Jr, Vareechon C, Cowden S, et al. Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection[J]. J Clin Invest, 2012, 122(7): 2482-2498. DOI: 10.1172/JCI63239.
- [9] Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, et al. Interleukin-6: structure-function relationships[J]. Protein Sci, 1997, 6(5): 929-955. DOI: 10.1002/pro.5560060501.
- [10] Sproson EL, Thomas KM, Lau LC, et al. Common airborne fungi induce species-specific effects on upper airway inflammatory and remodelling responses[J]. Rhinology, 2016, 54(1): 51-55. DOI: 10.4193/Rhino14.278.
- [11] Fenton RR, Molesworth-Kenyon S, Oakes JE, et al. Linkage of IL-6 with neutrophil chemoattractant expression in virus-induced ocular inflammation[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(3): 737-743. DOI: 10.1007/s00417-001-0392-4.
- [12] Li X, Jamal M, Guo P, et al. Irisin alleviates pulmonary epithelial barrier dysfunction in sepsis-induced acute lung injury via activation of AMPK/SIRT1 pathways[J/OL]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109363 [2021-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31545277/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109363.
- [13] Li S, Gaur U, Chong CM, et al. Berberine protects human retinal pigment epithelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative damage through activation of AMPK[J/OL]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6): 1736 [2021-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29895743/>. DOI: 10.3390/ijms19061736.
- [14] Katsiogiannis S, Tenta R, Skopouli FN. Autoimmune epithelitis (Sjögren's syndrome); the impact of metabolic status of glandular epithelial cells on auto-immunogenicity[J/OL]. J Autoimmun, 2019, 104: 102335 [2021-05-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31540861/>. DOI: 10.1016/j.jaut.2019.102335.
- [15] Pandey A, Ding SL, Qin QM, et al. Global reprogramming of host kinase signaling in response to fungal infection[J]. Cell Host Microbe, 2017, 21(5): 637-649. DOI: 10.1016/j.chom.2017.04.008.
- [16] Kumar A, Giri S, Kumar A. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside-mediated adenosine monophosphate-activated protein kinase activation induces protective innate responses in bacterial endophthalmitis[J]. Cell Microbiol, 2016, 18(12): 1815-1830. DOI: 10.1111/cmi.12625.
- [17] Choi JW, Lee J, Lee JH, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids prevent *Toxoplasma gondii* infection by inducing autophagy via AMPK activation[J/OL]. Nutrients, 2019, 11(9): 2137 [2021-05-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31500218/>. DOI: 10.3390/nu11092137.
- [18] Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine[J/OL]. Arthritis Res Ther, 2006, 8 Suppl 2: S2 [2021-05-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16899106/>. DOI: 10.1186/ar1916.
- [19] 李豪亮,朱然,张希熹,等.茄病镰刀菌对人角膜上皮细胞 NOD2 表达及相关炎症因子分泌水平的影响[J].眼科新进展,2021,41(7): 633-637. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2021.0130.
- [20] Li HL, Zhu R, Zhang XX, et al. Effects of *Fusarium solanum* on NOD2 expression and secretion of related inflammatory factors in human corneal epithelial cells[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2021, 41(7): 633-637. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2021.0130.
- [21] Alcantara C, Maza PK, Barros BC, et al. Role of protein kinase C in cytokine secretion by lung epithelial cells during infection with *Paracoccidioides brasiliensis*[J/OL]. Pathog Dis, 2015, 73(7): ftv045 [2021-05-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26152710/>. DOI: 10.1093/femspd/ftv045.
- [22] 苏晶,崔红平.烟曲霉菌性角膜炎大鼠角膜 IL-6 和 IL-10 的表达[J].中华实验眼科杂志,2008,26(8): 579-582. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2008.08.006.
- [23] Su J, Cui HP. Expression of IL-6 and IL-10 in cornea of rats with *Aspergillus fumigatus* keratitis[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2008, 26(8): 579-582. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2008.08.006.
- [24] Sproson EL, Thomas KM, Lau LC, et al. Common airborne fungi induce species-specific effects on upper airway inflammatory and remodelling responses[J]. Rhinology, 2016, 54(1): 51-55. DOI: 10.4193/Rhino14.278.
- [25] 张红敏,刘素素,许中中,等.小鼠真菌性角膜炎中主要免疫细胞的作用[J].中华实验眼科杂志,2012,30(9): 779-784. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.09.003.
- [26] Zhang HM, Liu SS, Xu ZZ, et al. The role of major immune cells in mouse fungal keratitis[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2012, 30(9): 779-784. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.09.003.
- [27] 董亚慧,陈鹏,张真真,等.白细胞介素-6 对糖尿病小鼠角膜缘干细胞活化的促进作用和角膜上皮愈合的加速作用[J].中华实验眼科杂志,2017,35(5): 423-431. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.05.008.
- [28] Dong YH, Chen P, Zhang ZZ, et al. Interleukin-6 promotes the activation of limbal-stem cells and the acceleration of corneal epithelial healing in diabetic mice[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(5): 423-431. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.05.008.
- [29] Hsu EC, Kulp SK, Huang HL, et al. Integrin-linked kinase as a novel molecular switch of the IL-6-NF- κ B signaling loop in breast cancer[J]. Carcinogenesis, 2016, 37(4): 430-442. DOI: 10.1093/carcin/bgw020.
- [30] Wang L, Walia B, Evans J, et al. IL-6 induces NF- κ B activation in the intestinal epithelia[J]. J Immunol, 2003, 171(6): 3194-3201. DOI: 10.4049/jimmunol.171.6.3194.

(收稿日期:2021-07-10 修回日期:2021-12-23)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

