

IDO在烟曲霉菌性角膜炎中的免疫调节作用

郭姝萱^{1,2}, 姜楠^{1,2}, 马静静^{1,2}, 姜薇^{1,2}

¹青岛大学, 山东 青岛

²青岛大学附属医院, 山东 青岛

Email: Yankegsx@163.com

收稿日期: 2021年3月25日; 录用日期: 2021年4月21日; 发布日期: 2021年4月28日

摘要

吲哚胺2,3-双加氧酶(Indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)是一种具有免疫调节功能并参与色氨酸降解的限速酶, 可以通过影响巨噬细胞作用调节炎症反应中的免疫应答, 但IDO在烟曲霉菌性角膜炎中的其他免疫调节作用及机制仍不十分明了, 因此, 本实验在烟曲霉菌感染的小鼠模型及中性粒细胞模型上进行研究。方法: 建立小鼠真菌性角膜炎动物模型, 记录小鼠角膜炎症评分; 采用RT-PCR检测烟曲霉菌菌丝刺激不同时间点的小鼠中性粒细胞中IDO、IDO下游因子AhR及炎症因子(TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12) mRNA的表达。采用RT-PCR检测烟曲霉菌灭活菌丝刺激中性粒细胞16小时后各组炎症因子(IL-1 β , TNF- α , IL-6) mRNA的表达变化。

关键词

IDO, 真菌性角膜炎, 免疫调控

Indoleamine 2,3-Dioxygenase Adjusts Immunization in *Aspergillus Fumigatus* Keratitis

Shuxuan Guo^{1,2}, Nan Jiang^{1,2}, Jingjing Ma^{1,2}, Wei Jiang^{1,2}

¹Qingdao University, Qingdao Shandong

²Department of Ophthalmology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Email: Yankegsx@163.com

Abstract

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is a rate-limiting enzyme that functions as an immunomodulator and participates in the degradation of tryptophan. IDO can regulate the immune response of inflammation by affecting the action of macrophages. However, the immunomodulatory role and mechanism of IDO in *Aspergillus fumigatus* keratitis are still not very clear. Therefore, this study was conducted on the mouse model of *Aspergillus fumigatus* infection and the neutrophils model. METHODS: Animal models were developed to measure inflammatory scores and RT-PCR was used to detect the mRNA expression of IDO, downstream factors AHRs of IDO and inflammatory factors (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12) in the cornea of mice stimulated by *Aspergillus niacae* at different time points. RT-PCR was used to detect the mRNA expression of inflammatory factors (IL-1 β , TNF- α , IL-6) in each group after 16 hours of stimulation by *Aspergillus fumigatus* inactivated hyphae.

Keywords

IDO, *Aspergillus Fumigatus*, Innate Immune

Copyright © 2021 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)是一种可以导致视力损害甚至失明的顽固性角膜炎。常见的致病菌包括镰刀菌、烟曲霉菌和念珠菌[1]。当烟曲霉菌侵入角膜后,烟曲霉菌所致的真菌性角膜炎便开始进展[2] [3]。角膜上皮与基质层被烟曲霉菌感染后会出现一系列病变,例如角膜血管的扩张充血、一系列炎症因子招募大量炎症细胞至炎症部位。与此同时,角膜组织受到烟曲霉菌刺激后可以释放大量免疫活性物质,这些物质对于机体后续炎症及免疫反应至关重要[4] [5] [6]。

白细胞介素是参与真菌性角膜炎炎症反应及免疫调节的重要的促炎细胞因子,IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-12 等细胞因子均在炎症反应中表达并进一步调控炎症反应的发展[7]。在真菌病原体的刺激下,IL-6 诱导的信号通路被激活,进一步促进巨噬细胞和 T-细胞趋化因子的分泌[8] [9]。IL-1 β 作为炎症反应的“主力军”,可以通过 Dectin-1、LOX-1 等信号通路激活[10]参与炎症反应。TNF- α 作为具有广泛调节作用的细胞因子,在真菌性角膜炎中参与炎症反应并具有炎症调节作用[11]。吲哚胺 2,3-双加氧酶(Indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)是一种参与色氨酸降解的限速酶,能够将色氨酸转化为犬尿氨酸并诱导对烟曲霉菌的免疫耐受[12] [13]。IDO 具有免疫调节剂的功能,有报道称,IDO 可以通过抑制 T-细胞相关免疫应答促进免疫耐受[14]。另外,IDO 可以通过巨噬细胞调节炎症及免疫反应进程并维持免疫进程的平衡[15],起到免疫保护作用,但 IDO 在中性粒细胞水平鲜少研究。

本研究将通过烟曲霉菌感染的动物模型及中性粒细胞模型,研究 IDO 在真菌性角膜炎中的免疫调控作用并研究 IDO 参与炎症反应的机制。

2. 实验材料

2.1. 实验对象

2.1.1. 真菌菌种

编号为 3.0772 的标准烟曲霉菌菌株(中国普通微生物菌种保藏中心)。

2.1.2. 实验动物

体重约为 20 g 的 7 周至 8 周龄健康 C57BL/6 雌性小鼠(济南鹏悦实验动物繁育有限公司)。

2.1.3. 小鼠腹腔中性粒细胞

利用 percoll 法由小鼠腹腔中提取, 具体方法见下文(2.3.5 提取小鼠腹腔中性粒细胞)。

2.2. 试剂和耗材

2.2.1. 烟曲霉菌性角膜炎模型的建立

水合氯醛(10%)青岛大学附属医院, 封口膜(制备角膜接触镜)上海三踏生物有限公司, 外科 5-0 黑丝线 上海浦东金环医疗用品股份有限公司。

2.2.2. 烟曲霉菌的培养

沙氏培养基 北京索莱宝公司。

2.2.3. 中性粒细胞提取

酪蛋白 美国 Sigma 公司, DMEM 培养基 美国 Gibco 公司。

2.2.4. 动物和细胞实验预处理

1-甲基-DL-色氨酸(1-MT)美国 Sigma 公司。

2.2.5. RT-PCR

RNA 裂解液 大连 TaKaRa 公司, 异丙醇分析纯 江苏强盛功能化学股份有限公司, 逆转录试剂盒 南京挪威赞公司, 氯仿分析纯 江苏强盛功能化学股份有限公司, SYBR 大连 TaKaRa 公司, DEPC 水, 上海生物工程有限公司, 引物的设计与合成 大连 TaKaRa 公司。

2.3. 实验方法

2.3.1. 烟曲霉菌的培养与孢子、菌丝刺激液的制备

室温条件下, 烟曲霉菌孢子接种于沙氏琼脂培养基, 35℃ 孵育 5 天。在 28℃ 的 CO₂ 恒温培养箱中培育 7 天。收取菌丝, 置于摇床中, 恒温 37℃, 120 rpm 转速, 进行 3 天到 5 天的培养并随时观察菌丝的形态, 待菌丝为团块状时进行菌丝收集。研磨菌丝, 制备烟曲霉菌菌液(1 × 10⁸ CFU/ml)。4℃, 4500 rpm 转速条件下进行 10 分钟离心, 离心后弃去上清液。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。将灭活菌丝在 4℃, 4500 rpm 转速条件下进行 10 分钟离心, 离心后弃去上层酒精, 使用无菌磷酸盐缓冲液清洗 3 遍, 计数板计数, 将浓度调整为 1 × 10⁸ CFU/ml。

2.3.2. 建立烟曲霉菌性角膜炎小鼠模型

将 8% 的水合氯醛注入小鼠腹腔片刻后即可对小鼠实施麻醉, 用尖刀片刮除小鼠角膜的上皮层(约占角膜面积的 1/2~2/3)后, 再将烟曲霉活菌(1 × 10⁸ CFU/mL)涂抹在角膜中央的破损处, 封口膜自制的小鼠角膜接触镜进行覆盖, 缝合睑裂。使用裂隙灯显微镜观察小鼠角膜感染情况, 处死小鼠后进行角膜收集。实验设计严格遵循实验动物使用的伦理准则, 并获取伦理委员会批准。

2.3.3. 小鼠角膜炎症评分

在烟曲霉菌性角膜炎小鼠模型建立后第三天, 对各组小鼠的角膜炎症程度进行评级划分, 将角膜溃疡面积、溃疡形态、混浊程度各分为 I-IV 级(1~4 分), 总分为三项评分之和(0~12 分), 评分原则如表 1 [16]。

Table 1. Clinical score of keratitis

表 1. 角膜炎临床炎症评分

	I 级	II 级	III 级	IV 级
溃疡面积	1%~25%	26%~50%	51%~75%	76%~100%
混浊程度	轻度混浊	较混浊	不均匀混浊	均匀、重度混浊
	瞳孔可见	虹膜可见	虹膜不见	
溃疡形态	不规则	轻度水肿	重度水肿, 龛样溃疡或后弹力层膨出	穿孔或后弹力层膨出

2.3.4. IDO 抑制剂 1-MT 对动物模型的预处理

随机小鼠将分成两组, 一组在建模前一天开始每天予以 IDO 特异性抑制剂 1-MT (1 mg/ml)混悬液灌胃预处理, 另一组给予等量 PBS 灌胃作为对照。每只小鼠的右眼构建烟曲霉菌性角膜炎的动物模型, 左眼不予处理, 在建模后第 3 天进行小鼠角膜收集, 此时实验模型可分为四组: 损伤对照组、1-MT 组、感染组、1-MT + 感染组。随后, 对收集的小鼠角膜进行 RT-PCR 实验。

2.3.5. 小鼠腹腔提取中性粒细胞

1) 称重 9 g 酪蛋白溶于 50 ml 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液, 向 C57BL/6 小鼠的腹腔内注射 1 ml 酪蛋白溶液, 间隔 24 小时后再次注射 1 ml 酪蛋白溶液, 3 小时后引颈处死小鼠并使用 75% 乙醇消毒。

2) 使用已消毒的剪刀纵向剪开小鼠腹部皮肤, 确保腹膜完整。使用 5 ml 注射器吸取 5 ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 注入小鼠腹腔并对腹腔进行按摩, 保证中性粒细胞能被充分冲洗下来, 为更加充分地冲洗, 重复冲洗一次。

3) 培养液在 4℃, 2000 rpm 转速条件下进行 10 分钟离心, 倒掉上清, DMEM 重悬细胞后用 percoll 法对中性粒细胞进行分离。加入适量含有 10%FBS 的 DMEM 重悬细胞混匀后, 显微镜下计数, 将细胞接种到 12 孔板中, 在 37℃ 培养箱中孵育 2 小时到 3 小时之后贴壁的即为中性粒细胞。

2.3.6. 中性粒细胞的刺激实验

1) 将 1-MT 粉末溶于 1 mM 的 NaOH 中, 再使用 5 mM 盐酸调整 pH 值到 7.4, 终浓度为 50 mM, 避光储存于 4℃ 冰箱。其他试剂根据说明书进行溶解处理。

2) 加入 IDO 抑制剂 1-MT (1 mM)预处理 0.5 小时。

3) 加入烟曲霉菌灭活菌丝(5×10^6 CFU/ml)与中性粒细胞共培养, 不同时间点(0 小时、4 小时、8 小时、12 小时、18 小时、20 小时、24 小时)收取细胞进行 RT-PCR 实验。

2.3.7. RT-PCR 实验方法

1) 总 RNA 的提取

RNA 裂解液收集小鼠腹腔中性粒细胞, 裂解 30 分钟, 12,000 rpm 转速条件下进行 5 分钟离心, 吸取上清液移入新的 EP 管中。将 200 μ l 三氯甲烷加入上清液中, 混匀后在室温条件下放置 5 分钟, 待分层后再次在 4℃, 12,000 rpm 转速条件下进行 5 分钟离心。完毕后可见样本分为三层, 吸取上层 RNA 移入新的 EP 管中。加入相同体积的异丙醇, 充分混匀后室温条件下放置 10 分钟。将样本第三次在 4℃, 12,000 rpm 转速条件下进行 10 分钟离心。去除上清液, 将 500 μ l 75% 的乙醇(由无水乙醇和 DEPC 水配置

而成)沿管壁缓慢加入,充分混匀后在 4℃, 12,000 rpm 转速条件下进行 5 分钟离心。室温条件下进行 20 分钟干燥。使用适量 DEPC 水溶解 RNA, 可储存于-80℃冰箱备用。

2) RNA 浓度检测

吸取 1 μl RNA, 使用核酸蛋白分析仪对所有样本在 260 nm/280 nm 处的 OD 值(吸光度值)以及 A260/280 的比值进行分别测定。根据测得的 RNA 浓度计算 2 μgRNA 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 反应

该反应重复 40 个循环(图 1), 循环结束后记录循环数阈值结果。引物序列见表 2。

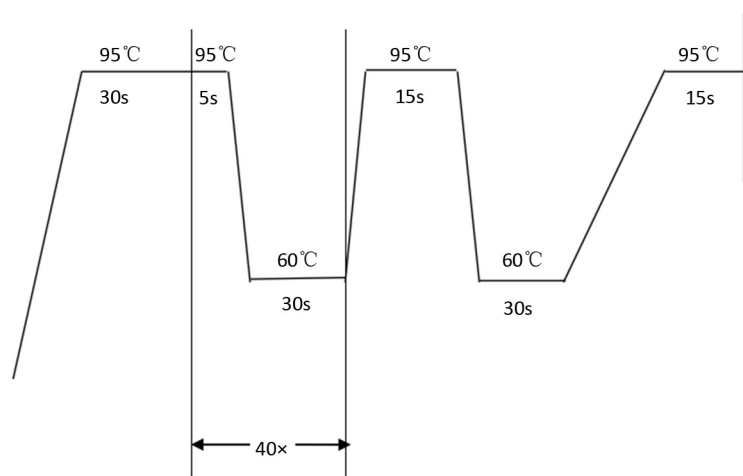


Figure 1. PCR reaction conditions

图 1. PCR 反应条件

Table 2. Primer sequence

表 2. 引物序列

Gene	Primer sequence
mβ-action	F:GATTACTGCTCTGGCTCCTAGC R:GACTCATCGTACTCCTGCTTGC
mIL-1β	F:CGCAGCAGCACATCAACAAGAGC R:TGTCCTCATCCTGGAAGGTCCACG
TNF-α	F:CCTGTAGCCCACGTCGTAG R:GGGAGTAGACAAGGTACAACCC
mIL-6	F:CACAAGTCCGGAGAGGAGAC R:CAGAATTGCCATTGCACAAC
mIDO	F:TCCTGGCAAACCTGGAAGAAA R:CACCAATAGAGAGACGAGGAAGAAG
mAhR	F:ATTGCCAAGTGCCAAATGGA R:GGTAAAGTGTTCAGGTGCTGTAAGA
mIL-10	F:TGCTAACCGACTCCTTAATGCAGGAC R:CCTTGATTCTGGGCCATGCTTCTC
mIL-12	F:GGGACCAAACCAGCACATTG R:TACCAAGGCACAGGGTCATCA

2.3.8. 统计学处理

各个实验均独立操作, 各组样本量 $n \geq 6$, 至少重复操作三次。为了比较两组之间的差异, 采用 t 检验来确定差异的显著性。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Graphpad Prism 8.0 软件, 对各组结果进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为标准, 差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. IDO 对烟曲霉菌性角膜炎的影响

首先, 我们建立对照组、1-MT 组、A.F. 组、1-MT + A.F. 组小鼠模型, 感染烟曲霉菌后第 3 天在裂隙灯下观察各组小鼠的角膜感染情况。结果发现, A.F. 组的角膜出现明显的炎症浸润和角膜水肿。与 A.F. 组相比, 1-MT + A.F. 组的炎症加重, 临床评分更高, 角膜溃疡更严重(图 2, $P < 0.001$), 对照组和 1-MT 组的角膜没有明显的角膜病变。

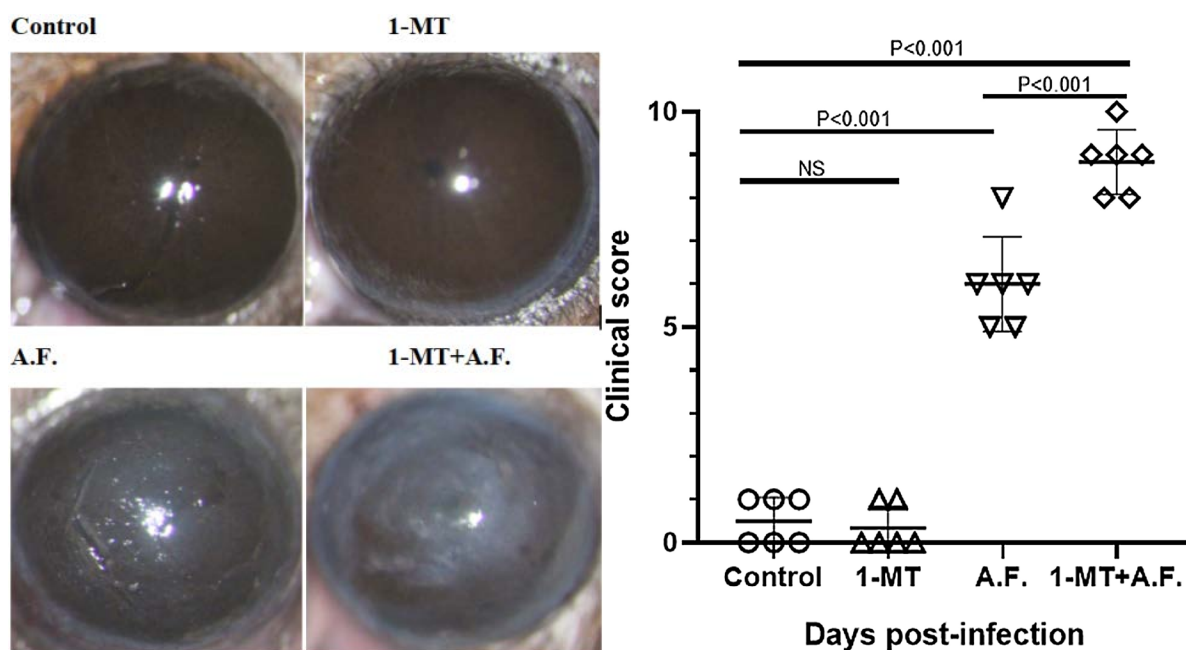


Figure 2. IDO effect the progression and clinical score of *Aspergillus fumigatus* keratitis

图 2. IDO 对小鼠烟曲霉菌性角膜炎进展及临床评分的影响

感染烟曲霉菌后第 3 天损伤对照组(Control)、1-MT 组(1-MT)、感染组(A.F.)、1-MT + 感染组(1-MT + A.F.)的小鼠眼前节照相和角膜疾病反应临床评分

3.2. IDO、下游因子 AhR 及炎症因子在烟曲霉菌感染的中性粒细胞中的表达

为了明确 IDO、IDO 下游因子 AhR 及炎症因子在中性粒细胞中的表达, 我们建立烟曲霉菌感染的中性粒细胞中进行研究。结果显示 IDO 的 mRNA 在 16 小时到达高峰(图 3(a), $P < 0.05$), AhR mRNA 表达水平在 12~16 小时达到高峰(图 3(b), $P < 0.05$), IL-1 β 、IL-6、IL-10mRNA 表达水平在 8 小时达到高峰(图 3(c), 图 3(e), 图 3(f), $P < 0.05$), TNF- α mRNA 表达水平在 24 小时最高(图 3(d), $P < 0.05$), IL-12mRNA 表达水平在 16 小时达到高峰(图 3(g), $P < 0.05$)。

正常组(Normal)和烟曲霉菌灭活菌丝刺激不同时间点后中性粒细胞 IDO、AhR 及炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-10、IL-12 mRNA 的表达。

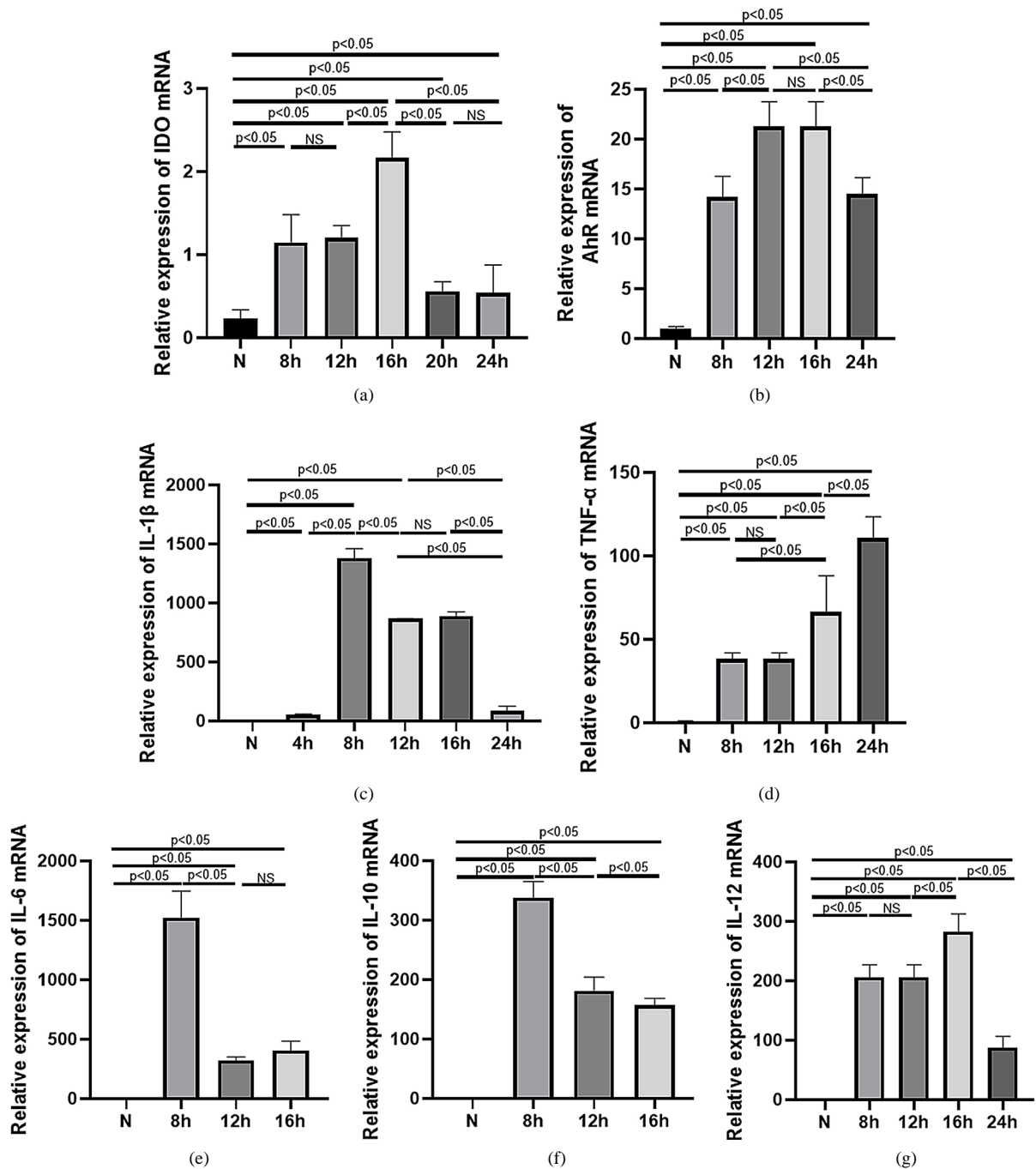


Figure 3. Expression of IDO, AHR and inflammatory factors in neutrophils infected by *Aspergillus fumigatus*
图 3. IDO、AhR 及炎症因子在烟曲霉菌感染的中性粒细胞中的表达

3.3. IDO 对烟曲霉菌感染的小鼠腹腔中性粒细胞中炎症因子表达的影响

为研究 IDO 对中性粒细胞炎症因子表达的影响,提取小鼠腹腔中性粒细胞,1-MT 预处理 0.5 小时后应用烟曲霉菌灭活菌丝刺激细胞,分为正常组、A.F.、1-MT + A.F.组,小鼠腹腔中性粒细胞刺激 16 小时,RT-PCR 结果表明,IL-1β、TNF-α、IL-6 在烟曲霉菌刺激中性粒细胞后表达上调,而应用 1-MT 处理中性粒细胞后,IL-1β、TNF-α、IL-6mRNA 表达进一步上调(图 4(a)~(c), $P < 0.05$)。

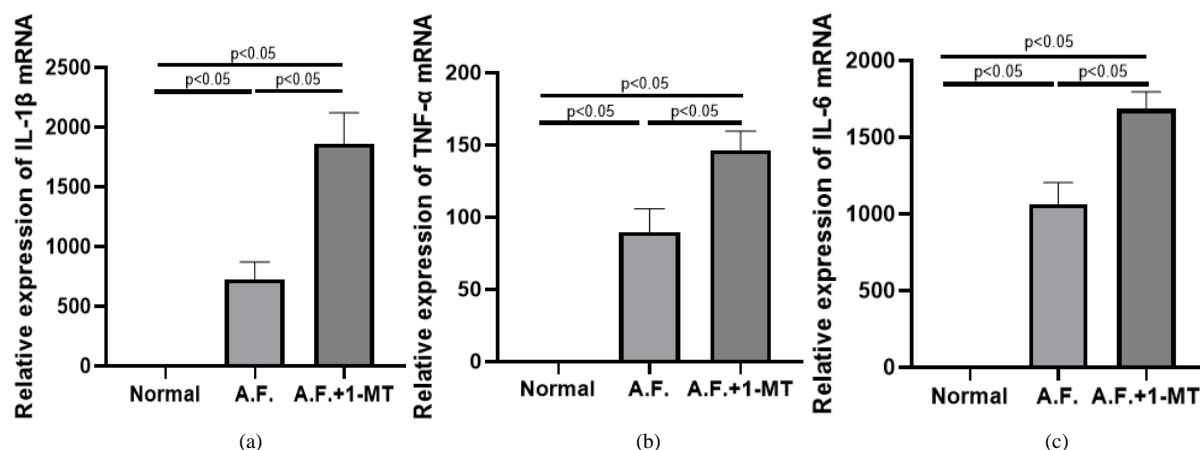


Figure 4. The effect of IDO on the expression of inflammatory cytokines in peritoneal neutrophils of mice infected with *Aspergillus fumigatus*

图 4. IDO 对烟曲霉菌感染的小鼠腹腔中性粒细胞炎症因子表达的影响

正常组、A.F.组、1-MT + A.F.组在 16 小时时小鼠腹腔中性粒细胞炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6mRNA 的表达。

4. 讨论

真菌性角膜炎是一种难治性角膜炎，可以导致严重的视力损害甚至失明。角膜炎发生时，角膜组织出现角膜水肿、溃疡，大量的炎症细胞因子聚集到溃疡部位，并伴有大量的免疫活性物质释放等显著的病理改变[17]。角膜组织受到烟曲霉菌刺激后释放出来的免疫活性物质对于清除病原体、维持角膜正常结构以及调节真菌性角膜炎炎症进程具有重要意义。适度的炎症反应可以加速病原体的杀灭，具有免疫保护作用，但过度的炎症反而会使病灶的炎症病变损伤加重[18]。

在烟曲霉菌菌丝感染角膜上皮及基质层之后，角膜组织会出现水肿、混浊及溃疡等症状，随之发生改变的是炎症细胞和细胞因子一系列的炎症免疫应答。IDO 在炎症和自身免疫性疾病中发挥着重要作用。前期研究表明，IDO 表达于小鼠角膜中，并可能参与了相关的炎症调节[19]。另外，在人角膜上皮细胞模型和巨噬细胞模型中，烟曲霉菌性感染进程中也有 IDO 的参与[20]。真菌病原体入侵角膜组织后，被模式识别受体(Toll 样受体，包括 TLR2 和 TLR4)识别，角膜炎症反应及免疫应答被激活[21]。在此过程中，被认为是炎症程度标志物的模式识别受体下游因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 被激活，表达升高[22]。

为了明确烟曲霉菌性角膜炎炎症的进程以及 IDO 在此进程中发挥的调节作用，本实验建立了小鼠烟曲霉菌性角膜炎模型及中性粒细胞模型进行一系列研究。在体内实验研究中，我们发现，小鼠角膜经过烟曲霉菌感染后，角膜炎症病变明显，而 IDO 抑制后，小鼠烟曲霉菌性角膜炎炎症程度进一步加重，临床炎症评分明显增加。由此可知，IDO 参与烟曲霉菌性角膜炎疾病进程并发挥免疫抑制炎症的免疫保护作用。

另外，我们建立了中性粒细胞感染的体外实验模型，通过 PCR 发现 IDO 在中性粒细胞中表达，其表达趋势与中性粒细胞相关炎症因子表达趋势一致，IDOmRNA 的表达在 16 小时到达高峰，AhR mRNA 表达水平在 12~16 小时达到高峰，IL-1 β 、IL-6、IL-10mRNA 表达水平在 8 小时达到高峰，TNF- α mRNA 表达水平在 24 小时最高，IL-12mRNA 表达水平在 16 小时达到高峰。接下来，我们应用 1-MT 对小鼠中性粒细胞进行处理并用灭活烟曲霉菌菌丝刺激 16 小时，发现炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 在感染后表达上调，而加入 IDO 抑制剂后，炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6mRNA 表达进一步上调。在机体炎症反应过程中，炎症因子起到“指挥官”的重要作用[23]。实验发现，在烟曲霉菌刺激的中性粒细胞中，IDO 可以

通过减少炎症细胞因子的释放从而产生炎症调节作用。有研究表明,IDO 在代谢途径中,产生了 L-犬尿氨酸代谢物,这种代谢物具有广泛的活性,使中性粒细胞的进一步激活受损,从而减少中性粒细胞相关炎症因子的表达[24] [25] [26] [27]。另有研究表明,在人体肠炎模型中,NF- κ B 和 MAPK 途径受到病原体刺激后被激活,促进炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的表达,而 IDO 代谢生成的 L-犬尿氨酸能够抑制 NF- κ B 通路[28] [29],减少促炎细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的进一步表达和释放[30],因此,IDO 发挥了炎症反应和免疫调节的重要作用。

5. 结论

总之,在烟曲霉菌性角膜炎中,IDO 的抑制会导致烟曲霉菌感染加重。另外,IDO 表达于中性粒细胞中,并通过减少炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的释放减轻炎症反应,在烟曲霉菌性角膜炎疾病进程中起着重要作用,而 IDO 在烟曲霉菌性角膜炎愈后过程中的作用有待于进一步探讨,或许,IDO 可以成为下一步炎症治疗的新靶点。

参考文献

- [1] Carvalho, A., Cunha, C., Bozza, S., *et al.* (2012) Immunity and Tolerance to Fungi in Hematopoietic Transplantation: Principles and Perspectives. *Frontiers in Immunology*, **3**, 156.
- [2] De Luca, A., Bozza, S., Zelante, T., *et al.* (2010) Non-Hematopoietic Cells Contribute to Protective Tolerance to *Aspergillus fumigatus* via a TRIF Pathway Converging on IDO. *Cellular & Molecular Immunology*, **7**, 459-470. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.43>
- [3] Romani, L., Bistoni, F., Perruccio, K., *et al.* (2006) Thymosin Alpha1 Activates Dendritic Cell Tryptophan Catabolism and Establishes a Regulatory Environment for Balance of Inflammation and Tolerance. *Blood*, **108**, 2265-2274. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-004762>
- [4] Munn, D.H. and Mellor, A.L. (2013) Indoleamine 2,3 Dioxygenase and Metabolic Control of Immune Responses. *Trends in Immunology*, **34**, 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.10.001>
- [5] Mahmoudi, S., Masoomi, A., Ahmadikia, K., *et al.* (2018) Fungal Keratitis: An Overview of Clinical and Laboratory Aspects. *Mycoses*, **61**, 916-930. <https://doi.org/10.1111/myc.12822>
- [6] Manikandan, P., Abdel-Hadi, A., Randhir Babu Singh, Y., Revathi, R., Anita, R., Banawas, S., Bin Dukhyil, A.A., Alshehri, B., Shobana, C.S., Panneer Selvam, K. and Narendran, V. (2019) Fungal Keratitis: Epidemiology, Rapid Detection, and Antifungal Susceptibilities of *Fusarium* and *Aspergillus* Isolates from Corneal Scrapings. *BioMed Research International*, **2019**, Article ID: 6395840. <https://doi.org/10.1155/2019/6395840>
- [7] Tang, Q., Che, C., Lin, J., He, H., Zhao, W., Lv, L., Zhao, G., *et al.* (2019) Maresin1 Regulates Neutrophil Recruitment and IL-10 Expression in *Aspergillus fumigatus* Keratitis. *International Immunopharmacology*, **69**, 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.01.032>
- [8] 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>
- [9] 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>
- [10] El-Zaatari, M., Chang, Y.M., Zhang, M., *et al.* (2014) Tryptophan Catabolism Restricts IFN- γ -Expressing Neutrophils and *Clostridium difficile* Immunopathology. *The Journal of Immunology*, **193**, 807-816. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302913>
- [11] Loughman, J.A., Yarbrough, M.L., Tiemann Kristin, M., *et al.* (2016) Local Generation of Kynurenines Mediates Inhibition of Neutrophil Chemotaxis by Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, **84**, 1176-1183. <https://doi.org/10.1128/IAI.01202-15>
- [12] Niu, Y., Zhao, G., Li, C., Lin, J., Jiang, N., Che, C., Zhang, J., Xu, Q., *et al.* (2018) *Aspergillus fumigatus* Increased PAR-2 Expression and Elevated Proinflammatory Cytokines Expression through the Pathway of PAR-2/ERK1/2 in Cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **59**, 166-175. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-21887>
- [13] Jiang, J.Q., Li, C., Cui, C.X., Ma, Y.N., Zhao, G.Q., Peng, X.D., Xu, Q., Wang, Q., Zhu, G.Q., Li, C.Y., *et al.* (2019) Inhibition of LOX-1 Alleviates the Proinflammatory Effects of High-Mobility Group Box 1 in *Aspergillus fumigatus* Keratitis. *International Journal of Ophthalmology*, **12**, 898-903. <https://doi.org/10.18240/ijo.2019.06.03>

- [14] 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>
- [15] Moreira-Teixeira, L., Stimpson, P.J., Stavropoulos, E., *et al.* (2020) Type I IFN Exacerbates Disease in Tuberculosis-Susceptible Mice by Inducing Neutrophil-Mediated Lung Inflammation and NETosis. *Nature Communications*, **11**, Article No. 5566. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19412-6>
- [16] Pereira, S.A. and Livi, G.P. (1996) Aromatic Amino-Acid Biosynthesis in *Candida albicans*: Identification of the ARO4 Gene Encoding a Second DAHP Synthase. *Current Genetics*, **29**, 441-445. <https://doi.org/10.1007/BF02221512>
- [17] Jiang, N., Zhao, G.Q., Lin, J., *et al.* (2016) Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in a Murine Model of *Aspergillus fumigatus* Keratitis. *International Journal of Ophthalmology*, **9**, 491-496.
- [18] Jiang, N., Zhao, G., Lin, J., *et al.* (2015) Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Involved in the Inflammation Response of Corneal Epithelial Cells to *Aspergillus fumigatus* Infections. *PLoS ONE*, **10**, e0137423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137423>
- [19] Jiang, N., Zhang, L., Zhao, G., *et al.* (2020) Indoleamine 2,3-Dioxygenase Regulates Macrophage Recruitment, Polarization and Phagocytosis in *Aspergillus fumigatus* Keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **61**, 28. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.8.28>
- [20] Zhao, G., Hu, M., Li, C., *et al.* (2018) Osteopontin Contributes to Effective Neutrophil Recruitment, IL-1 β Production and Apoptosis in *Aspergillus fumigatus* Keratitis. *Immunology & Cell Biology*, **96**, 401-412. <https://doi.org/10.1111/imcb.12010>
- [21] Dickinson, C.M., LeBlanc, B.W., Edhi, M.M., *et al.* (2018) Leukadherin-1 Ameliorates Endothelial Barrier Damage Mediated by Neutrophils from Critically Ill Patients. *Journal of Intensive Care*, **6**, Article No. 19. <https://doi.org/10.1186/s40560-018-0289-5>
- [22] Zhang, L., Jiang, N., Zhao, G., *et al.* (2020) Expression and Role of Aryl Hydrocarbon Receptor in *Aspergillus fumigatus* Keratitis. *International Journal of Ophthalmology*, **13**, 199-205. <https://doi.org/10.18240/ijo.2020.02.01>
- [23] Liu, H., Liu, L., Fletcher, B.S., *et al.* (2006) Novel Action of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Attenuating Acute Lung Allograft Injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **173**, 566-72. <https://doi.org/10.1164/rccm.200509-1413OC>
- [24] Griffith, J.W., Sokol, C.L., Luster, A.D., *et al.* (2014) Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annual Review of Immunology*, **32**, 659-702. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145>
- [25] Silva, R.L., Lopes, A.H., Guimarães, R.M., *et al.* (2017) CXCL1/CXCR2 Signaling in Pathological Pain: Role in Peripheral and Central Sensitization. *Neurobiology of Disease*, **105**, 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.06.001>
- [26] Planagumà, A., Domènech, T., Pont, M., *et al.* (2015) Combined Anti CXC Receptors 1 and 2 Therapy Is a Promising Anti-Inflammatory Treatment for Respiratory Diseases by Reducing Neutrophil Migration and Activation. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, **34**, 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2015.08.002>
- [27] Takaishi, M., Satoh, T., Akira, S., *et al.* (2018) Regnase-1, an Immunomodulator, Limits the IL-36/IL-36R Autostimulatory Loop in Keratinocytes to Suppress Skin Inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*, **138**, 1439-1442. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.12.033>
- [28] Guo, J., Tu, J., Hu, Y., *et al.* (2019) Cathepsin G Cleaves and Activates IL-36 Gamma and Promotes the Inflammation of Psoriasis. *Drug Design, Development and Therapy*, **13**, 581-588. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S194765>
- [29] Degroote, R.L., Weigand, M., Hauck, S.M., *et al.* (2019) IL8 and PMA Trigger the Regulation of Different Biological Processes in Granulocyte Activation. *Frontiers in Immunology*, **10**, 3064. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03064>
- [30] Renassia, C., Louis, S., Cuvelier, S., *et al.* (2020) Neutrophils from Hereditary Hemochromatosis Patients Are Protected from Iron Excess and Are Primed. *Blood Advances*, **4**, 3853-3863. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002198>