

CRAMP诱导自噬提高烟曲霉角膜炎中巨噬细胞的杀真菌能力

侯晓晨, 彭旭东, 林 静*

青岛大学附属医院眼科, 山东 青岛

收稿日期: 2023年2月21日; 录用日期: 2023年3月16日; 发布日期: 2023年3月23日

摘 要

CRAMP是一种能够抑制多种真菌生长的抗微生物肽, 据报道CRAMP在细菌感染中能够调控巨噬细胞。本文对小鼠烟曲霉菌性角膜炎中CRAMP的治疗效果及对巨噬细胞的调控展开研究。方法: 体内实验通过建立小鼠烟曲霉菌角膜炎模型, 比较CRAMP或PBS处理组在裂隙灯照片、临床评分以及真菌负荷方面的差异。体外实验通过流式细胞技术分析CRAMP对巨噬细胞吞噬、杀灭细胞内杀真菌力的影响。RT-PCR和免疫蛋白印迹法检测巨噬细胞自噬相关基因和蛋白的表达, 如LAMP-3、Beclin-1。结果: 在烟曲霉角膜炎期间, CRAMP减少了小鼠角膜的真菌负荷并降低了角膜的临床评分。虽然CRAMP对烟曲霉感染巨噬细胞的吞噬作用无显著影响, 但可显著加速巨噬细胞对细胞内真菌的清除。进一步的机制研究表明, CRAMP可上调LAMP-3和Beclin-1的表达, 并通过诱导自噬提高巨噬细胞胞内杀真菌能力。结论: CRAMP可诱导自噬提高巨噬细胞的杀真菌能力, 改善小鼠烟曲霉角膜炎预后。

关键词

CRAMP, 烟曲霉菌, 巨噬细胞, 自噬, 杀真菌力

CRAMP Inducing Autophagy to Improve the Fungicidal Ability of Macrophages during *Aspergillus fumigatus* Keratitis

Xiaochen Hou, Xudong Peng, Jing Lin*

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

Received: Feb. 21st, 2023; accepted: Mar. 16th, 2023; published: Mar. 23rd, 2023

*通讯作者 Email: linjing_yk@126.com

文章引用: 侯晓晨, 彭旭东, 林静. CRAMP 诱导自噬提高烟曲霉角膜炎中巨噬细胞的杀真菌能力[J]. 临床医学进展, 2023, 13(3): 4335-4343. DOI: 10.12677/acm.2023.133622

Abstract

CRAMP is an antimicrobial peptide that inhibits the growth of a variety of fungi and has been reported to modulate macrophages in bacterial infections. In this paper, the therapeutic effect of CRAMP on *Aspergillus fumigatus* keratitis in mice and the regulation of macrophage were studied. **Methods:** *In vivo*, mice models with *Aspergillus fumigatus* keratitis were established to compare the statistic differences in slit-lamp photographs, clinical scores, and fungal loads between the CRAMP-treated or PBS-treated groups. *In vitro*, the effects of CRAMP on the phagocytosis and intracellular fungicidal ability of macrophages were analyzed by flow cytometry. RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of autophagy related genes and proteins of macrophages, such as LAMP-3 and Beclin-1. **Results:** During *Aspergillus fumigatus* keratitis, CRAMP reduced fungal loads of mice corneas and lowered clinical scores. Although CRAMP had no significant effect on the phagocytosis of macrophages infected with *Aspergillus fumigatus*, it could significantly accelerate the intracellular fungal clearance by macrophages. Further mechanism studies showed that CRAMP could up-regulate the expression of LAMP-3 and Beclin-1, and elevate the intracellular fungicidal ability of macrophages by inducing autophagy. **Conclusion:** CRAMP can induce autophagy to elevate the fungicidal ability of macrophages and improve the prognosis of *Aspergillus fumigatus* keratitis in mice.

Keywords

CRAMP, *Aspergillus fumigatus*, Macrophages, Autophagy, Fungicidal Ability

Copyright © 2023 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)是一种进展迅速的、致盲率高的严重角膜感染性疾病,发病率逐年增加[1]。植物划伤角膜损伤是真菌性角膜炎的主要危险因素,同时隐形眼镜和激素的广泛应用也越发成为重要的危险因素[2] [3] [4]。然而,目前临床上最常用的抗真菌药物(例如氟康唑、伊曲康唑等)具有显著的局限性,如价格昂贵、通透性较差以及可供选择的范围有限而易产生耐药性等[5] [6] [7]。这些使得真菌性角膜炎成为一种严重威胁视力的难治性疾病[8] [9]。因此,我们急需探索针对真菌角膜炎的安全、有效的新型治疗方案。

当真菌开始入侵机体时, Dectin-1、Dectin-2、EphA2 等真菌识别受体识别真菌,通过信号级联反应募集并激活免疫细胞、调控炎症因子的分泌和病原体的清除[10]-[16]。在此过程中,巨噬细胞是一种具有多功能的重要免疫细胞,他既能通过 M2/M1 极化调控炎症反应[17],又能通过吞噬、自噬等清除病原体,减轻组织损伤[18] [19]。CRAMP 是一种天然抗微生物肽[20] [21]。它广泛存在于多种上皮细胞和免疫细胞中[22] [23],也是细菌感染中调控巨噬细胞防御的重要分子之一[24] [25] [26],例如 CRAMP 诱导巨噬细胞自噬或活性氧的生成上调巨噬细胞胞内细菌清除力[24] [25];在细菌感染的巨噬细胞中, Cathelicidin 还能直接结合并中和脂多糖(LPS),抑制 Toll 样受体 4 (TLR 4)炎症信号通路的激活,限制促炎症因子和一氧化氮的分泌[26] [27]。然而,CRAMP 在鼠烟曲霉菌角膜炎中的作用和机制及其对巨噬细胞的调控仍知之甚少。

在本研究中, 我们发现在烟曲霉角膜炎期间, CRAMP 减少了小鼠角膜的真菌负荷并降低了角膜的临床评分。CRAMP 可上调 LAMP-3 和 Beclin-1 的表达, 通过诱导自噬提高巨噬细胞的杀真菌能力, 减轻小鼠烟曲霉角膜炎严重程度。

2. 材料和方法

2.1. 真菌培养和 CFSE 染色

于中国微生物菌种保藏管理中心购买标准烟曲霉菌菌株(编号: 3.0772)。烟曲霉菌分生孢子在 37°C 下于沙氏葡萄糖琼脂板上培养 4 天。用含少量玻璃珠的无菌水清洗平板制备分生孢子悬浮液, 并经 40 μm 无菌尼龙网过滤, 于 4°C 保存。

为了对烟曲霉菌分生孢子进行染色, 当分生孢子生长到对数相时, 我们将 5×10^8 CFU 烟曲霉菌分生孢子浸泡到 50 $\mu\text{g/mL}$ 5(6)-二醋酸羧基荧光素(CFSE; Sigma-Aldrich, 美国)在 37°C 的 3 ml PBS 中浸泡 30 分钟。染色的分生孢子在含 2% 胎牛血清(FBS; Gibco, 美国)的 5 ml PBS 中洗涤, 并在 1.5 mL PBS 中重悬。

2.2. 角膜炎动物模型

2 月龄雌性 C57BL/6 小鼠购自山东省济南市鹏月动物实验中心。所有小鼠均按照视力和眼科研究协会(ARVO)关于在眼科和视觉研究中使用动物的声明进行处理。我们的实验已经通过了实验动物伦理委员会的批准, 批准号是: QYFYWZLL27576。实验前用裂隙灯显微镜观察所有角膜确保眼部健康。然后用 8% 水合氯醛麻醉小鼠。向无菌微升注射器(10 μL ; Hamilton Corp, 瑞士)中加入 2 μL 孢子悬液(3×10^7 CFU/mL), 插入右眼角膜中央间质层。完成基质内注射约 6 小时, 实验组右眼用 5 μL CRAMP (150 $\mu\text{g/mL}$) 局部滴眼治疗, 对照组右眼同时给予 PBS 滴眼, 左眼不给予处理作为空白对照。抽筋治疗从感染后 6 小时开始, 然后在感染后 1 到 5 天每天 3 次给药。使用之前描述的疾病严重程度统计比较量表[17]对感染后第 1、3 和 5 天的角膜状态进行分级, 采用临床评分评估角膜炎的严重程度, 并于裂隙灯下拍摄小鼠眼前节照片。

2.3. 真菌负荷分析

如之前所描述的菌落计数方法[17], 我们将感染后 3 天不同处理的小鼠角膜组织研磨成匀浆。用 PBS 稀释后, 在 37°C 下均匀的平铺于沙氏葡萄糖琼脂板上孵育 30 小时。拍摄琼脂板上所形成的真菌菌落并计数, 以定量不同处理的小鼠角膜中存活的真菌。

2.4. 小鼠腹腔提取巨噬细胞

向 C57BL/6 小鼠的腹腔内注射 1 ml 3% 的硫代乙醇培养基溶液, 5 天后引颈处死小鼠并使用 75% 乙醇消毒过的剪刀纵向剪开小鼠的腹部皮肤, 确保腹膜完整。将 5 ml 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液, 注入腹腔, 按摩小鼠腹腔并冲洗。冲洗得到的细胞悬液离心 10 分钟(4°C, 1250 rpm), 用无菌红细胞裂解液处理再离心, 重悬后, 计数细胞并接种到 6 孔板中, 在 37°C 培养箱中孵育 2 小时之后得到贴壁的巨噬细胞。

2.5. 巨噬细胞刺激实验

向 6 孔板中的小鼠腹腔巨噬细胞中加入 CRAMP (10 $\mu\text{g/mL}$; GL biochem, 中国上海)或 PBS 预先孵育 10 分钟, 最后加入烟曲霉菌分生孢子(1×10^7 CFU/MI, MOI = 5)共培养。在感染后不同时间点(0 小时、1 小时、4 小时、5 小时)收取细胞进行 RT-PCR, Western blot 或流式细胞术实验。

2.6. 吞噬试验

如前所述[19], 在感染前 10 分钟将 CRAMP (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)或 PBS 加入到小鼠巨噬细胞悬液中, 然后加入 CFSE 标记的烟曲霉菌分生孢子(MOI = 5)共培养 1 小时。之后将细胞悬液转移到冰中停止吞噬, 用冷的 FACS 缓冲液(Gibco)彻底清洗巨噬细胞。流式细胞仪测定含分生孢子的巨噬细胞比例。吞噬率(%)为巨噬细胞吞噬 CFSE 标记的分生孢子的百分比。

2.7. 杀真菌试验

6 孔板中的小鼠腹腔巨噬细胞中加入或不加入自噬抑制剂 3-MA (10 mM; MedChemExpress, 中国上海), 2 小时后再加入 CRAMP (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)或 PBS。10 分钟后加入 CFSE 标记的烟曲霉菌分生孢子共培养 1 小时(MOI = 5), 通过将巨噬细胞转移到冰中停止吞噬。然后用冷的 PBS 彻底清洗巨噬细胞。将细胞重悬后, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 10% FBS 的 RPMI 1640 温培养基中再培养 5 小时。含烟曲霉菌分生孢子的巨噬细胞用流式细胞仪测定。杀灭率(%) = [1 - (再培养后剩余 CFSE 阳性巨噬细胞的百分比/再培养开始时 CFSE 阳性巨噬细胞的百分比)] \times 100%。

2.8. RT-PCR 实验

采用总 RNA 提取试剂(Takara, 日本)溶液从小鼠角膜和巨噬细胞中提取总 RNA, 并用分光光度法定量。以 β -actin 基因的表达为内参。用 PrimeScript RT Reagent Kit (Takara)将 RNA 逆转录为互补 cDNA。采用 LightCycler 480 SYBR Green Master Mix 体系进行 PCR 扩增: 5 min 95 $^{\circ}\text{C}$; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 变性, 60 $^{\circ}\text{C}$ 25 s 退火, 72 $^{\circ}\text{C}$ 25 s 延伸, 循环 42 次[17]。反应结束后, 根据内参及目的基因循环数, 计算 CRAMP、LAMP-3 和 Beclin-1 mRNA 相对表达量。引物序列如表 1 所示。

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR

表 1. RT-PCR实验中所用的引物序列

Gene	GcnBank No.	Primer Sequence (50)
β -actin (mouse)	NNL007393.3	F: GAT TAC TGC TCT GGC TCC TAG C R: GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG C
CRAMP (mouse)	NM_009921.2	F: GCCGCTGATTCTTTTGACAT R:GCCAAGGCAGGCCTACTACT
Beclin (mouse)	NM_003766.5	F: CCAGATGCGTTATGCCAGAC R: CATTCCATTCCACGGGAACAC R: TCC ATG GCC ACA ACA ACT GAC
LAMP-3 (mouse)	NM_177356.3	F: AGCAGAGATGGGACTAGCACT R: CAGATGCATGGGTTAGGCTGG

F: Forward; R: Reverse.

2.9. Western Blot 实验

在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 小鼠角膜蛋白或巨噬细胞蛋白在 RIPA 裂解缓冲液(Solarbio, 中国北京)中裂解 2 小时, 裂解液每 15 分钟搅拌一次。然后在离心 15 分钟(4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000 rpm)。总蛋白用双辛酸法定量, 用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白, 并转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上(Solarbio)。膜浸于 Western 阻滞缓冲液(Beyotime, 中国江苏)中封闭 3 小时后, 与抗 Beclin-1 (1:1500; Cell Signaling Technology, 美国)或 GAPDH (1:1000; Elabscience, 美国)抗体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。清洗后用相应的二抗(Elabscience)孵育 1 小时, DAB 显色。Image Lab 软件对条带进行分析。

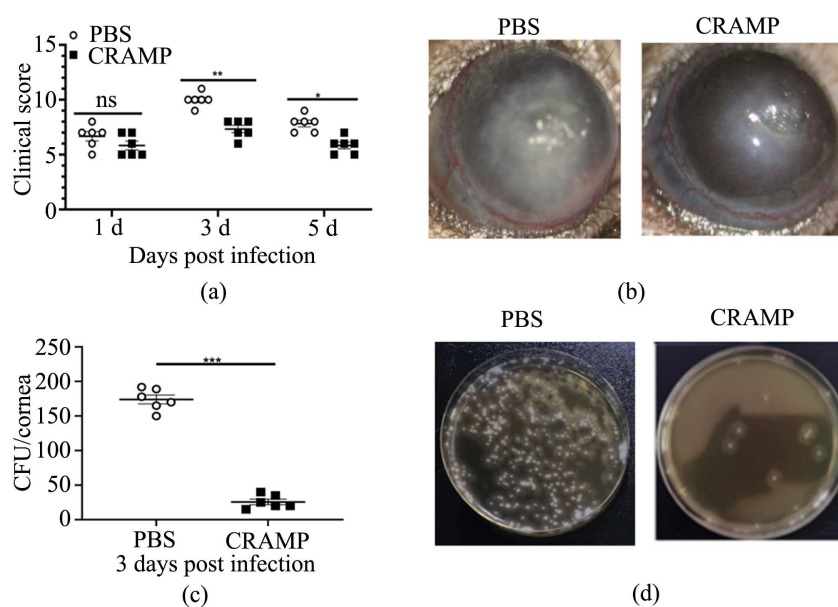
2.10. 统计学分析

两组各时间点临床评分差异采用 Mann-Whitney U 检验。两组间比较采用双尾 Student's *t* 检验, 三组及以上比较采用单因素方差分析。各组间采用 Bonferroni 检验方法进行多重比较。使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学分析, 数据均以平均值 \pm SEM 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。每项实验至少独立重复 3 次。

3. 结果

3.1. CRAMP 能减轻小鼠烟曲霉菌角膜炎

在小鼠烟曲霉菌角膜炎中, PBS 处理组从第 3 天起临床评分明显高于 CRAMP 处理组(图 1(a))。感染后第 3 天, 与 PBS 处理组相比, CRAMP 处理的小鼠角膜水肿度更轻微、溃疡面积更小、透明度更高(图 1(b))、真菌负荷明显更低(图 1(c)和图 1(d))。表明 CRAMP 可以降低烟曲霉菌角膜炎小鼠的临床评分并减少真菌负荷, 改善临床症状。

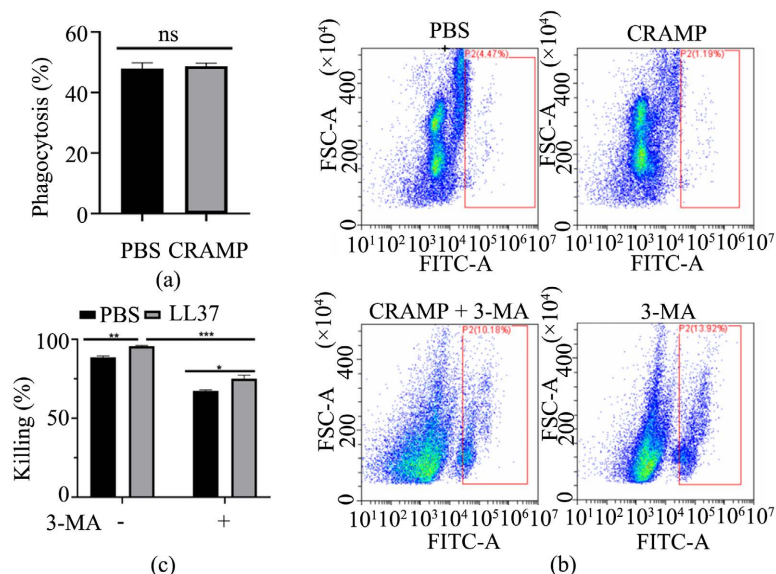


注: (a) CRAMP 或 PBS 处理的小鼠角膜在感染烟曲霉菌的第 1、3、5 天的临床评分($n = 6$ 组)。感染后第 3 天, CRAMP 或 PBS 处理的小鼠角膜的裂隙灯照片(b)和真菌负荷(c)、(d)。

Figure 1. CRAMP alleviates the severity of *Aspergillus fumigatus* keratitis in mice
图 1. CRAMP 减轻小鼠烟曲霉菌性角膜炎的严重程度

3.2. CRAMP 能通过自噬促进巨噬细胞对细胞内烟曲霉菌分生孢子的清除

流式细胞技术显示烟曲霉菌感染后 1 小时, CRAMP 处理组巨噬细胞吞噬率与 PBS 处理组无统计学差异(图 2(a)), 说明了 CRAMP 并没有影响巨噬细胞对烟曲霉菌分生孢子的吞噬作用。将感染后 1 小时的巨噬细胞彻底洗净后, 单独培养 4 小时, CRAMP 处理组含荧光标记的分生孢子的巨噬细胞比例明显少于 PBS 处理组(图 2(b)), 说明 CRAMP 处理组细胞内分生孢子存活几率减少。计算获得 CRAMP 处理组巨噬细胞的胞内真菌杀伤率高于 PBS 处理组(图 2(c))。与单纯 CRAMP 处理组相比, 预先加入自噬抑制剂 3-MA 的 CRAMP 处理组含荧光标记的分生孢子的巨噬细胞比例明显上升(图 2(b)), 而胞内真菌杀伤率明显下降(图 2(c))。这些表明 CRAMP 通过自噬快速清除胞内烟曲霉菌。



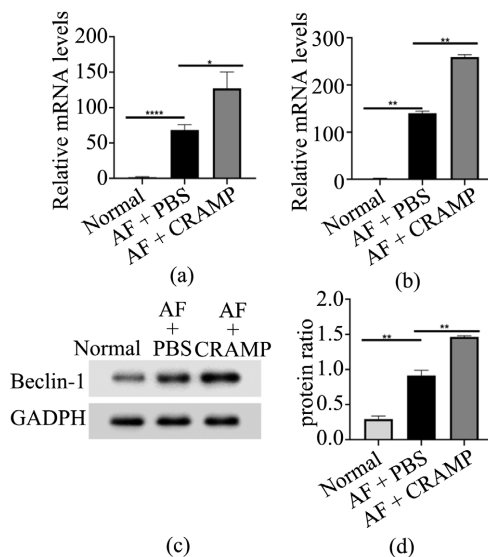
注: (a)烟曲霉菌感染后 1 小时, CRAMP 或 PBS 处理组巨噬细胞吞噬率。将感染后 1 小时的巨噬细胞彻底洗净后,再进一步培养 4 小时,各处理组剩余含荧光标记的分生孢子的巨噬细胞比例(b)和巨噬细胞胞内真菌杀伤率(c)。

Figure 2. CRAMP can increase the intracellular fungicidal ability of macrophages

图 2. CRAMP 能提高巨噬细胞的胞内真菌杀伤力

3.3. CRAMP 能提高烟曲霉菌感染的巨噬细胞的自噬水平

PCR 的实验结果揭示了 CRAMP 能够促进烟曲霉菌感染的巨噬细胞自噬相关基因如 LAMP3 或 Beclin-1 mRNA 的表达(图 3(a)和图 3(b))。Western Blot 揭示了 CRAMP 上调感染后的巨噬细胞 Beclin-1 蛋白的表达,进一步验证了 CRAMP 与自噬的紧密联系。



注: 烟曲霉菌感染巨噬细胞后, CRAMP 或 PBS 处理组 LAMP3 mRNA (a)、Beclin-1mRNA (b)以及 Beclin-1 蛋白((c)~(d))的表达。

Figure 3. CRAMP can up-regulate the expression of autophagy related genes and proteins in macrophages infected with *Aspergillus fumigatus*

图 3. CRAMP 能上调烟曲霉菌感染的巨噬细胞的自噬相关基因和蛋白的表达

4. 讨论

烟曲霉菌角膜炎是一种进展迅速、经常导致失明的严重疾病。真菌的生长和侵袭通常会引起过度炎症，导致严重的角膜损伤，如溃疡或穿孔[17]。因此，限制真菌负担和炎症反应在烟熏假单胞菌角膜炎中都很重要。CRAMP 是一种多功能的天然抗微生物肽，不仅能直接抑制微生物生长还能参与炎症反应调控[19]-[26]，在感染性疾病中具有重要价值。例如小鼠烟曲霉菌肺炎中，CRAMP 可直接抑制烟曲霉菌菌丝生长并抑制巨噬细胞炎症因子分泌[19]。在我们的研究中，通过建立小鼠烟曲霉菌性角膜炎模型，我们发现相比于对照组小鼠，CRAMP 处理的小鼠真菌负荷明显减少，临床评分显著降低，裂隙灯照片可清楚地显示感染后第 3 天 CRAMP 处理的小鼠角膜溃疡面积更小、角膜水肿更轻、透明度更高，这表明 CRAMP 在烟曲霉菌角膜炎中起到了有效清除真菌和限制炎症反应的双重作用。

巨噬细胞是感染性疾病中一种重要的免疫细胞，它既能够消灭多种侵入人体的病原又能通过调节 M2/M1 极化等调控炎症反应[24] [27]。而 CRAMP 是细菌感染中调控巨噬细胞防御力的主要因子之一[24] [25] [28]。例如：CRAMP 诱导巨噬细胞自噬或活性氧的生成上调巨噬细胞胞内细菌清除力[24] [25]；在细菌感染的巨噬细胞中，Cathelicidin 还能抑制 Toll 样受体 4 (TLR 4)炎症信号通路的激活，限制炎症反应[28]。因此，我们推测 CRAMP 可能通过调控巨噬细胞的免疫活动抵御烟曲霉菌角膜炎。我们的研究证实了这个推测。通过用流式细胞技术定量烟曲霉菌感染的巨噬细胞的吞噬率和胞内真菌杀伤率，我们发现烟曲霉菌感染时 CRAMP 虽然对巨噬细胞的吞噬力没有明显的影响，但却能显著上调巨噬细胞的胞内真菌杀伤力。

据报道，巨噬细胞可诱导自噬消灭细胞内的大肠杆菌[24]或结核分枝杆菌[25]，因此我们假设 CRAMP 可能是通过诱导自噬上调巨噬细胞的胞内真菌杀伤力。与此一致的是，在我们的实验中，CRAMP 诱导的胞内杀伤力的增加大部分被自噬抑制剂 3-MA 抵消。同时我们检测了自噬相关基因和蛋白的表达，发现 LAMP-3 mRNA、Beclin-1 mRNA 和 Beclin-1 蛋白水平也呈升高趋势，并且自噬蛋白表达升高的时间点与杀伤率强的时间点一致。这进一步验证了在烟曲霉菌性角膜炎中，CRAMP 可诱导自噬提高巨噬细胞对真菌的杀伤力。因此，用 CRAMP 调控巨噬细胞杀真菌能力可被认为是治疗真菌感染性疾病的有效的治疗方案。但这尚缺乏 CRAMP 对烟曲霉菌感染的巨噬细胞炎症信号通路及炎症因子分泌影响的研究，这将在我们未来的实验中进一步探索和完善。

参考文献

- [1] Li, C., Zhao, G., Che, C., *et al.* (2015) The Role of LOX-1 in Innate Immunity to *Aspergillus fumigatus* in Corneal Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **56**, 3593-3603. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15989>
- [2] Li, C., Zhao, G.Q., Che, C.Y., Lin, J., Li, N., Jia, W.Y., *et al.* (2012) Effect of Corneal Graft Diameter on Therapeutic Penetrating Keratoplasty for Fungal Keratitis. *International Journal of Ophthalmology*, **5**, 698-703.
- [3] He, K., Yue, L.H., Zhao, G.Q., Li, C., Lin, J., Jiang, N., *et al.* (2016) The Role of LOX-1 on Innate Immunity against *Aspergillus fumigatus* Keratitis in Mice. *International Journal of Ophthalmology*, **9**, 1245-1250.
- [4] Zhang, J., Zhao, G., Lin, J., Che, C., Li, C., Jiang, N., *et al.* (2016) Role of PTX3 in Corneal Epithelial Innate Immunity against *Aspergillus fumigatus* Infection. *Experimental Eye Research*, **167**, 152-162. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.11.017>
- [5] Latgé, J.P. (1999) *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Review*, **12**, 310-350. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.2.310>
- [6] O'Day, D.M., Head, W.S., Robinson, R.D. and Clanton, J.A. (1986) Corneal Penetration of Topical Amphotericin Band Natamycin. *Current Eye Research*, **5**, 877-882. <https://doi.org/10.3109/02713688609029240>
- [7] Peng, X.D., Zhao, G.Q., Lin, J., Jiang, N., Xu, Q., Zhu, C.C., *et al.* (2015) Fungus Induces the Release of IL-8 in Human Corneal Epithelial Cells, via Dectin-1-Mediated Protein Kinase C Pathways. *International Journal of Ophthalmology*, **8**, 441-447.

- [8] Kawakami, H., Inuzuka, H., Hori, N., Takahashi, N., Ishida, K., Mochizuki, K., *et al.* (2015) Inhibitory Effects of Antimicrobial Agents against *Fusarium* Species. *Medical Mycology*, **53**, 603-611. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv016>
- [9] Yilmaz, S., Ozturk, I. and Maden, A. (2007) Microbial Keratitis in West Anatolia, Turkey: A Retrospective Review. *International Ophthalmology*, **27**, 261-268. <https://doi.org/10.1007/s10792-007-9069-2>
- [10] Khani, S., Seyedjavadi, S.S., Hosseini, H.M., Goudarzi, M., Valadbeigi, S., Khatami, S., *et al.* (2020) Effects of the Antifungal Peptide Skh-AMP1 Derived from *Satureja khuzistanica* on Cell Membrane Permeability, ROS Production, and Cell Morphology of Conidia and Hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Peptides*, **123**, Article ID: 170195. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170195>
- [11] Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D. and Zychlinsky, A. (2012) Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annual Review of Immunology*, **30**, 459-489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>
- [12] Lübow, C., Bockstiegel, J. and Weindl, G. (2020) Lysosomotropic Drugs Enhance Pro-Inflammatory Responses to IL-1 β in Macrophages by Inhibiting Internalization of the IL-1 Receptor. *Biochemical Pharmacology*, **175**, Article ID 113864. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113864>
- [13] Swidergall, M., Solis, N.V., Wang, Z.P., *et al.* (2019) EphA2 Is a Neutrophil Receptor for *Candida albicans* that Stimulates Antifungal Activity during Oropharyngeal Infection. *Cell Reports*, **28**, 423-433. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.020>
- [14] Yang, H., Wang, Q., Han, L., Yang, X., Zhao, W., Lyu, L., *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>
- [15] Meresman, G.F., Götte, M. and Laschke, M.W. (2021) Plants as Source of New Therapies for Endometriosis: A Review of Preclinical and Clinical Studies. *Human Reproduction Update*, **27**, 367-392. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa039>
- [16] Cao, Y., Dai, B., Wang, Y., Huang, S., Xu, Y., Cao, Y., *et al.* (2008) *In Vitro* Activity of Baicalein against *Candida albicans* Biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **32**, 73-77. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.026>
- [17] 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>
- [18] Lee, H.H., Del Pozzo, J., Salamanca, S.A., *et al.* (2019) Reduced Phagocytosis and Killing of *Cryptococcus neoformans* Biofilm-Derived Cells by J774.16 Macrophages Is Associated with Fungal Capsular Production and Surface Modification. *Fungal Genetics and Biology*, **132**, Article ID: 103258. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103258>
- [19] Luo, X.-L., Li, J.-X., Huang, H.-R., *et al.* (2019) LL37 Inhibits *Aspergillus fumigatus* Infection via Directly Binding to the Fungus and Preventing Excessive Inflammation. *Frontiers in Immunology*, **10**, 283. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00283>
- [20] De Ullivarri, M.F., Arbulu, S., Garcia-Gutierrez, E. and Cotter, P.D. (2020) Antifungal Peptides as Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**, 105. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00105>
- [21] De Brucker, K., Delattin, N., Robijns, S., *et al.* (2014) Derivatives of the Mouse Cathelicidin-Related Antimicrobial Peptide (CRAMP) Inhibit Fungal and Bacterial Biofilm Formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **8**, 5395-5404. <https://doi.org/10.1128/AAC.03045-14>
- [22] Kolar, S.S., Baidouri, H. and McDermott, A.M. (2017) Role of Pattern Recognition Receptors in the Modulation of Antimicrobial Peptide Expression in the Corneal Epithelial Innate Response to *F. solani*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **58**, 2463-2472. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20658>
- [23] Lim, R., Barker, G. and Lappas, M. (2015) Human Cathelicidin Antimicrobial Protein 18 (hCAP18/LL-37) Is Increased in Foetal Membranes and Myometrium after Spontaneous Labour and Delivery. *Journal of Reproductive Immunology*, **107**, 31-42. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2014.10.002>
- [24] Chen, K.Q., Yoshimura, T., Gong, W.H., *et al.* (2021) Requirement of CRAMP for Mouse Macrophages to Eliminate Phagocytosed *E. coli* through an Autophagy Pathway. *Journal of Cell Science*, **134**, jcs252148. <https://doi.org/10.1242/jcs.252148>
- [25] Torres-Juarez, F., Cardenas-Vargas, A., Montoya-Rosales, A., *et al.* (2015) LL-37 Immunomodulatory Activity during *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Macrophages. *Infection and Immunity*, **83**, 4495-4503. <https://doi.org/10.1128/IAI.00936-15>
- [26] Rapala-Kozik, M., Bochenska, O., Zawrotniak, M., *et al.* (2015) Inactivation of the Antifungal and Immunomodulatory Properties of Human Cathelicidin LL-37 by Aspartic Proteases Produced by the Pathogenic Yeast *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, **83**, 2518-2530. <https://doi.org/10.1128/IAI.00023-15>

-
- [27] Peiser, L. and Gordon, S. (2001) The Function of Scavenger Receptors Expressed by Macrophages and Their Role in the Regulation of Inflammation. *Microbes and Infection*, **3**, 149-159. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01362-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01362-9)
- [28] Vandermeer, T.J., Menconi, M.J., Zhuang, J., *et al.* (1995) Protective Effects of a Novel 32-Amino Acid C-Terminal Fragment of CAP18 in Endotoxemic Pigs. *Surgery*, **117**, 656-662. [https://doi.org/10.1016/S0039-6060\(95\)80009-3](https://doi.org/10.1016/S0039-6060(95)80009-3)