

三四脯氨酸(TTP)对真菌性角膜炎中炎症反应的影响

隋佳琳^{1,2}, 吴媛², 栾军杰^{1,2*}

¹青岛大学医学部, 山东 青岛

²青岛大学附属医院眼科, 山东 青岛

收稿日期: 2023年2月27日; 录用日期: 2023年3月24日; 发布日期: 2023年3月31日

摘要

目的: 探讨三四脯氨酸(Tripetraproline, TTP)对小鼠烟曲霉菌性角膜炎中炎症反应的影响。方法: 体外实验用烟曲霉菌菌丝感染RAW264.7细胞后, 用RT-PCR方法检测RAW264.7细胞中不同时间段TTP、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6和CCL-2的mRNA表达。使用靶向TTP表达的短干扰RNA (TTP siRNA)或乱序干扰RNA (scrambled RNA)处理, 干扰TTP的表达。RT-PCR检测干扰TTP表达后烟曲霉菌诱导的RAW264.7中IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、CCL-2的mRNA的表达。结果: TTP在烟曲霉菌刺激的RAW264.7细胞中表达增加, TTP siRNA可以抑制RAW264.7细胞中TTPmRNA的表达, 干扰TTP的表达增加了烟曲霉菌诱导的RAW264.7细胞炎症反应中的IL-1 β 、IL-6和CCL-2的表达。结论: TTP抑制烟曲霉菌诱导的RAW264.7细胞炎症因子表达。

关键词

三四脯氨酸, 烟曲霉菌, RAW264.7细胞, 炎症

Effect of Tripetraproline (TTP) on Inflammatory Reaction in *Aspergillus fumigatus* Keratitis

Jialin Sui^{1,2}, Yuan Wu², Junjie Luan^{1,2*}

¹Medical College, Qingdao University, Qingdao Shandong

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

Received: Feb. 27th, 2023; accepted: Mar. 24th, 2023; published: Mar. 31st, 2023

*通讯作者 Email: yankeljj@126.com

文章引用: 隋佳琳, 吴媛, 栾军杰. 三四脯氨酸(TTP)对真菌性角膜炎中炎症反应的影响[J]. 临床医学进展, 2023, 13(3): 4948-4957. DOI: 10.12677/acm.2023.133706

Abstract

Objective: To explore the effect of Tristetraprolin (TTP) on *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) keratitis in mice. **Methods:** After RAW264.7 cells were infected with *Aspergillus fumigatus* mycelium *in vitro*, the expression of TTP mRNA in RAW264.7 cells was detected by RT-PCR. Then, RAW264.7 cells were treated with short interfering RNA (TTP siRNA) targeting TTP expression or out-of-order interfering RNA (scrambled RNA) and the mRNA expression of TTP, IL-1 β , TNF- α , IL-6 and CCL-2 by RT-PCR. **Results:** The expression of TTP increased in RAW264.7 cells stimulated by *Aspergillus fumigatus*. TTP siRNA could inhibit the expression of TTP mRNA in RAW264.7 cells. Interfering the expression of TTP increased the expression of IL-1 β , IL-6 and CCL-2 in the inflammatory reaction of RAW264.7 cells induced by *Aspergillus fumigatus*. **Conclusion:** TTP can inhibit the expression of inflammatory factors in RAW264.7 cells induced by *Aspergillus fumigatus*.

Keywords

Tristetraprolin, *Aspergillus fumigatus*, RAW264.7 Cells, Inflammation

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)是一种严重的威胁视力的疾病,发病率及失明率很高,占传染性角膜炎的1%~45% [1] [2]。真菌性角膜炎的易感因素包括角膜外伤、既往角膜手术史、慢性眼表疾病、局部或全身皮质类固醇使用、佩戴隐形眼镜以及免疫抑制性疾病,如获得性免疫缺陷综合征(Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) [3] [4]。常见的致病真菌包括霉菌属、镰刀菌属、弯孢菌属和念珠菌属。镰刀菌和曲霉菌在自然界中广泛存在,是免疫功能低下人群患严重疾病的常见病原体[5],也是眼部感染尤其是角膜炎的重要病原体[6]。那他霉素和两性霉素 B 分别是丝状真菌性角膜炎和酵母菌性角膜炎治疗的首选。三唑类伊曲康唑和氟康唑也逐渐成为眼部真菌病的治疗方案[6]。但由于对治疗的反应不佳以及抗真菌剂的效用性有限[7],大约 10%真菌性角膜炎患者会出现角膜穿孔,超过 60%的患者即使治疗也会永久丧失视力[8]。因此,真菌性角膜炎的诊治是眼科医生遇到的最棘手的问题之一。

在真菌性角膜炎的发病过程中,真菌与宿主接触,真菌可被宿主上皮细胞和免疫细胞上表达的模式识别受体(Pattern recognition receptors, PRR)识别,PPR 包括 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLRs, 包括 TLR2 和 TLR4)、C 型凝集素受体(CLR)和核苷酸结合寡聚结构域(NOD)样受体(NLRs)。这些 PPR 的表达和激活增加了炎症细胞因子的分泌,如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CCL-2,这些炎症因子的变化可以影响真菌性角膜炎的发生和发展。已有研究证实,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)可以募集白细胞并增强其抗真菌活性[9] [10],单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1/CCL-2)是调节单核细胞/巨噬细胞迁移和浸润的关键趋化因子之一,可以通过与其特异性受体 CCR2 结合加速巨噬细胞迁移至感染病灶[11]。在侵袭性肺曲霉病动物模型中,TNF- α 、MCP-1 表达水平升高,而这些趋化因子和促炎细胞因子的中和将导致真菌清除率降低,进而导致死亡率升高[10]。结核分枝杆菌感染后,Mincl (-/-)小鼠与野生型小鼠相比,突变小鼠细菌负荷更高且表达更高水平的促炎细胞因子,如白介素-1 β (IL-1 β),加重炎症反应,表明 IL-1 β 可能与炎症的严重程度相关[12]。

CXC 趋化因子配体 2 (CXCL-2)是趋化中性粒细胞的重要因子, 通过 CXC 趋化因子受体 2 (CXCR2)发出信号, 激活中性粒细胞[13], 参与中性粒细胞的粘附、爬行和迁移过程。现有研究证明, 真菌性角膜炎中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CCL-2、CXCL-2 表达升高, 抑制促炎细胞因子和趋化因子表达会减轻过度炎症反应, TTP 是 RNA 结合蛋白家族的成员, 通过与其靶 mRNA 的 3'端非翻译区域中富含腺苷-尿苷(AU)的元素(ARE)结合, 进而去除转录物的 poly(A)尾并最终导致其快速降解[14]。研究证实, TTP 在调节炎症[15][16][17]、细胞凋亡[18][19][20]、肿瘤发生[21]、组织发育和铁代谢[22]中发挥重要作用。目前已有研究证明 TTP 在炎症反应过程中上调, 促进促炎细胞因子 mRNA 的快速降解, 阻断促炎基因表达, 在慢性炎症性疾病中发挥抗炎作用, 如在神经系统疾病(包括阿尔茨海默病、多发性硬化症、缺血后神经变性、脑肿瘤等)中, 星形胶质细胞在脑组织炎症反应的调节中发挥着重要作用[23][24], 炎症刺激时, 星形胶质细胞中 TTPmRNA 表达增加, 通过 ARE 介导的 mRNA 衰变调节炎症反应, 被认为是神经炎症的治疗靶点[25]。在慢性阻塞性肺疾病动物模型中, 与对照组(野生型小鼠)相比, 实验组小鼠(基因突变型小鼠, 内源性 TTP 无法磷酸化, 使其作为 mRNA 失稳因子具有组成性活性)暴露于香烟烟雾 4 天后, 小鼠气道中性粒细胞和淋巴细胞的数量以及细胞因子的 mRNA 表达水平降低。实验组小鼠的肺部炎症、气道重塑和肺气肿样肺泡扩大减少, 肺功能得到改善。在自身免疫性(非感染性)葡萄膜炎动物模型中, TTP Δ ARE 小鼠(去除 TTP 富含 AU 元素(ARE)的不稳定基序, 是一种 TTP 过表达小鼠)对光受体间类视黄醇结合蛋白(Interphotoreceptor retinoid binding protein, IRBP)诱导的实验性自身免疫性葡萄膜炎(Experimental Autoimmune Uveitis, EAU)具有抵抗力, 淋巴细胞产生的促炎细胞因子 IFN- γ 、IL-17、IL-6 和 TNF- α 水平低于野生型小鼠[26]。但尚未有研究证明其在真菌性角膜炎中的抗炎作用, 本文将针对 TTP 在烟曲霉菌诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症中的表达及抗炎作用进行研究。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

RAW264.7 细胞系从中国科学院(上海)获得。TTP siRNA 及 scrambled siRNA 购自广州锐博生物技术有限公司。

2.2. 烟曲霉菌的培养

将标准烟曲霉菌菌株 3.0772 (中国普通微生物菌种保藏中心, 中国北京)接种于沙氏培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱培养, 待其生长至合适范围后, 用含有 0.1% Tween 20 的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗培养基获得分生孢子, 重复离心(12,000 rpm, 5 分钟)、弃上清、重悬得到分生孢子悬浮液, 4 $^{\circ}$ C 保存。将标准烟曲霉菌菌株接种于经过高压消毒后的含 300 ml Sabouroud 液体培养基的无菌烧瓶内, 纱布严密包扎瓶口。置于摇床培养箱(37 $^{\circ}$ C, 120 rpm)中培养。当菌丝生长至团块状时, 收集菌丝并研磨, PBS 洗涤、离心(4 $^{\circ}$ C、4500 rpm、10 分钟)、弃上清。菌丝中加入 75%的酒精吹打混匀后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜灭活菌丝。次日 PBS 洗涤后加入 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM; Gibco, 圣地亚哥, 加利福尼亚州, 美国)用于将烟曲霉菌稀释至 1×10^8 CFU/ml。灭活的烟曲霉菌丝体储存在-20 $^{\circ}$ C。

2.3. RAW 细胞处理

将接种于 12 孔板中的 RAW264.7 细胞于温箱培养至接近 80%融合, 无菌 PBS 洗涤并更换培养液, 2 小时后加入 5×10^6 CFU/mL 烟曲霉菌灭活菌丝刺激细胞, 分别处理 6、9、12、16 小时, 采用 RT-PCR 实验, 检测不同时间段 TTP、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、CCL-2 的 mRNA 表达水平。

将接种于 12 孔板中的 RAW264.7 细胞于温箱培养至接近 50%融合, 无菌 PBS 洗涤并更换培养液,

加入 TTP siRNA (50 nM)或 scrambled siRNA (50 nM)预处理 40 小时, 给予灭活烟曲霉菌菌丝刺激, 感染 9 小时后收集细胞用于 RT-PCR 实验, 检测 TTP、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、CCL-2 的 mRNA 表达水平。

2.4. RT-PCR

2.4.1. Total RNA 的提取

将含有 RAW264.7 细胞的 RNA 裂解液(500 μ L)的 EP 管置于冰盒上裂解 30 分钟。4 $^{\circ}$ C、12,000 rpm 离心 10 分钟, 取上清液入另一新的 EP 管中, 加入与 RNA 裂解液 1/5 体积量相等(100 μ L)的三氯甲烷, 上下颠倒混匀, 室温放置 5 分钟后, 4 $^{\circ}$ C、12,000 rpm 离心 15 分钟, 液体分为三层, 取上层液体于新的 EP 管中; 向装有上清液的 EP 管中加入异丙醇(200 μ L), 上下颠倒混匀, 室温放置 10 分钟, 4 $^{\circ}$ C、12,000 rpm 离心 10 分钟, 弃上清得到 RNA 沉淀。加入 500 μ L 75%乙醇, 上下颠倒混匀充分洗涤沉淀, 4 $^{\circ}$ C、12,000 rpm 离心 10 分钟, 弃上清, 待乙醇挥发。向 EP 管中加入 DEPC 水, 充分离心-振荡-离心, 使 RNA 沉淀溶解, 随后立刻测定 RNA 的含量及纯度。

2.4.2. Total RNA 含量及浓度测定

将核酸蛋白分析仪的 OD 值(optical density, OD)调零, 从以上 EP 管内吸取 1 μ L 样本, 分别测样本在 260 nm、280 nm 处的 OD 值以及 OD 260/OD 280 比值, 测量三次取平均值。根据测得的数值计算所需的样本溶液体积。

2.4.3. 逆转录

总 RNA 通过使用用于 qRT-PCR 的 HiScript III RT SuperMix (Vazyme Biotech, 中国南京)逆转录获得 cDNA。

2.4.4. PCR

将 cDNA 配置成 20 μ L 混合待测液, 置 PCR 仪上进行基因扩增反应。条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s (预变性) \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 45 s (变性) \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 15 s (退火、延伸) \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 15 s (溶解)。反应结束后, 根据内参, 计算目的基因 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

Table 1. Primer sequence of target gene

表 1. 目的基因引物序列

Gene	Primer	Nucleotide Sequence	GenBank
<i>β-Actin (mouse)</i>	F	5'-GAT TAC TGC TCT GGC TCC TAG C-3'	NM_007393.3
	R	5'-GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG C-3'	
<i>IL-1β (mouse)</i>	F	5'-CGC AGC AGC ACA TCA ACA AGA GC-3'	NM_008361.4
	R	5'-TGT CCT CAT CCT GGA AGG TCC ACG-3'	
<i>TNF-α (mouse)</i>	F	5'-ACC CTC ACA CTC AGA TCA TCT T-3'	NM_013693.3
	R	5'-GGT TGT CTT TGA GAT CCA TGC-3'	
<i>CCL-2 (mouse)</i>	F	5'-CAGCAGGTGTCCCAAAGAAG-3'	NM_011333
	R	5'-ATTTGGTTCGATCCAGGTT-3'	
<i>IL-6 (mouse)</i>	F	5'-TGATGGATGCTACCAAAGTGA-3'	NM_001314054.1
	R	5'-TGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG-3'	
<i>TTP (mouse)</i>	F	5'-ATCCCTCGGAGGACTTTGGA-3'	NM_011756.4
	R	5'-CAAAGGTGCAAAACCAGGGG-3'	

F, forward; R, reverse.

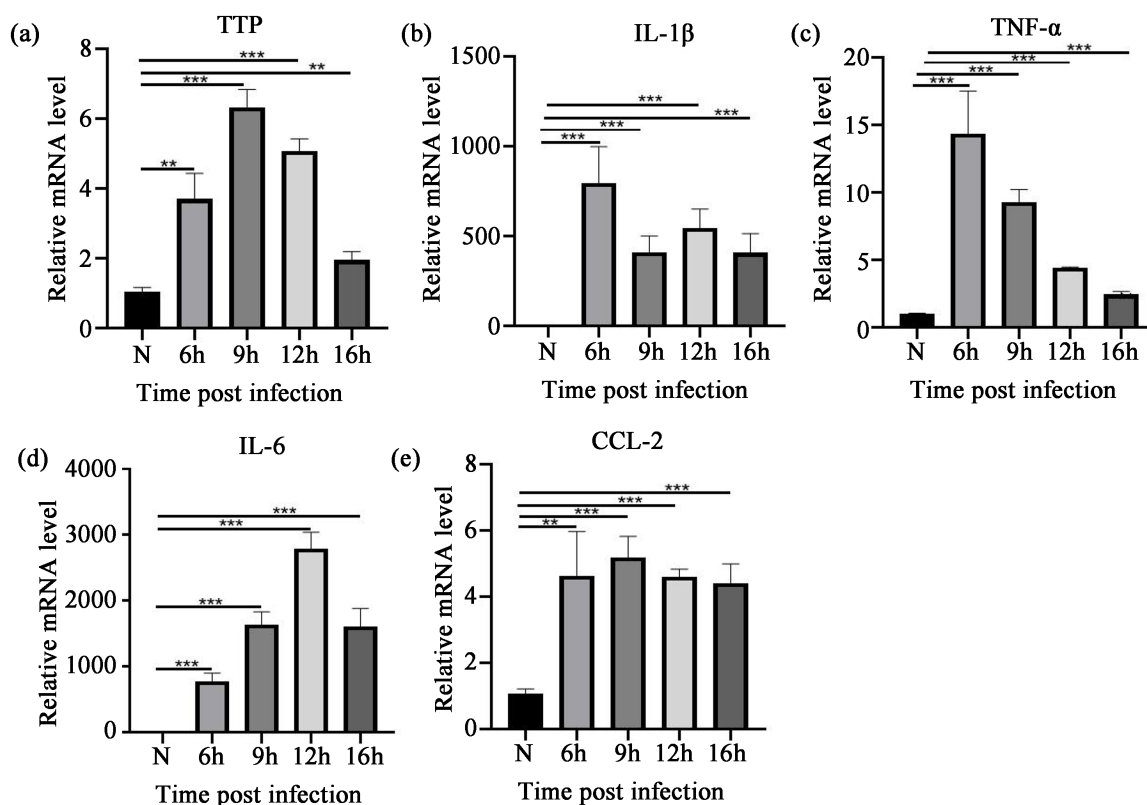
2.5. 统计学方法

GraphPad Prism (美国 GraphPad Prism 软件)作为分析软件。两组间临床评分差异采用 Mann-Whitney U 检验。所有数据均以独立实验的平均值 \pm 标准差表示。通过未配对的双尾 t 检验分析 qRT-PCR 数据。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 被视为有统计学意义。所有实验至少进行三次以确保准确性。

3. 结果

3.1. TTP 和炎症因子在烟曲霉菌刺激的 RAW264.7 细胞中的表达

我们检测了 TTP 及炎症因子在正常未感染 RAW264.7 细胞和烟曲霉处理后不同时间段 RAW264.7 细胞中的表达(图 1(a)~(e))。RT-PCR 显示, 与正常未感染组相比, TTPmRNA 在烟曲霉感染的 RAW264.7 细胞中的表达在 6、9、12、16 小时显著增加, 在 9 小时达到峰值。RAW264.7 细胞中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、CCL-2 的 mRNA 表达均在烟曲霉菌刺激后上调。



注: (a)烟曲霉菌感染 RAW264.7 细胞不同时间后 TTP 的 mRNA 表达变化, 在 6、9、12、16 小时显著增加, 在 9 小时达到峰值; (b)~(e)烟曲霉菌感染 RAW264.7 细胞不同时间后 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、CCL-2 的 mRNA 表达增加(n = 6 组)($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$)。

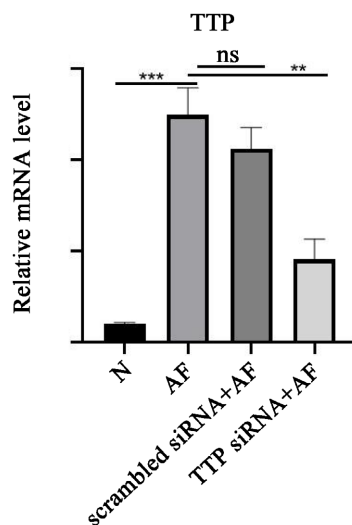
Figure 1. The mRNA expression of TTP、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 and CCL-2 in RAW264.7 cells treated by *Aspergillus fumigatus* hypha.

图 1. 烟曲霉菌菌丝刺激 RAW264.7 细胞后 TTP 以及炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和趋化因子 CCL-2 的 mRNA 表达

3.2. TTP siRNA 抑制 RAW264.7 细胞中 TTP 的表达

采用 TTP siRNA 预处理 RAW264.7 细胞, 然后烟曲霉菌感染细胞。采用 RT-PCR 法检测正常组(N)、

烟曲霉菌处理组(AF)、烟曲霉菌 + TTP siRNA 组(TTP siRNA + AF)以及烟曲霉菌 + scrambled siRNA 组(scrambled siRNA + AF) TTP 的 mRNA 表达变化, 验证干扰效率。RT-PCR 结果显示(图 2), 与烟曲霉菌处理组相比, 烟曲霉菌 + TTP siRNA 组中 TTPmRNA 表达显著下降, 差异有统计学意义; 烟曲霉菌 + scrambled siRNA 组 TTPmRNA 表达无明显变化。以上实验结果表明, TTP siRNA 成功干扰烟曲霉菌诱导的 RAW 细胞中 TTP 的表达。



注: TTP siRNA 预处理组和 scrambled siRNA 预处理组烟曲霉菌感染 9 h 后, 与烟曲霉菌处理组相比, 烟曲霉菌 + TTP siRNA 组中 TTPmRNA 表达显著下降, 差异有统计学意义; 烟曲霉菌 + scrambled siRNA 组 TTPmRNA 表达无明显变化(n = 6 组) (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ns 差异无统计学意义)

Figure 2. The down-regulation effect of TTP siRNA pretreatment on TTP mRNA expression in RAW264.7 cells induced by *Aspergillus fumigatus*

图 2. TTP siRNA 预处理对烟曲霉菌诱导的 RAW264.7 细胞中 TTP 的 mRNA 表达的下调作用

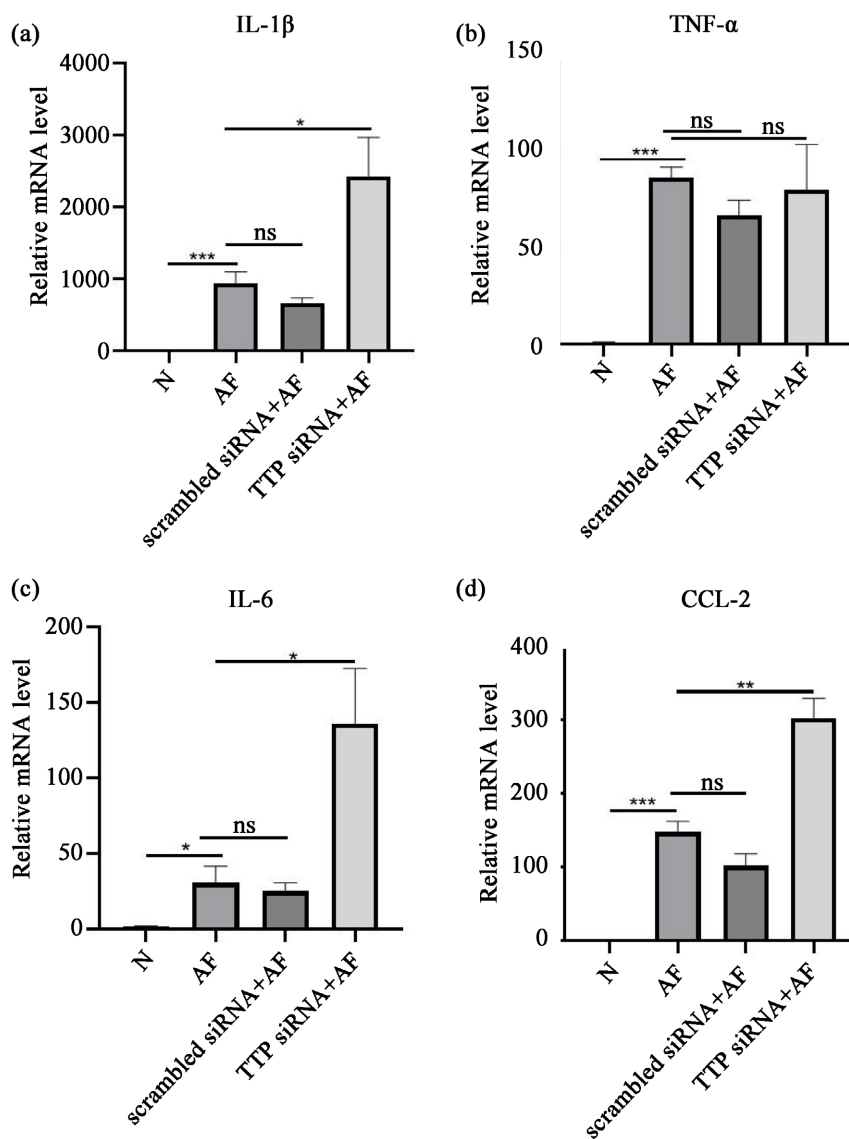
3.3. TTP 在基因水平抑制烟曲霉菌诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子的表达

为进一步验证 TTP 是否通过影响炎症因子和趋化因子发挥抑炎作用, 采用 RT-PCR 实验检测 TTP siRNA 处理对感染后 RAW264.7 细胞中炎症因子和趋化因子表达的影响。RT-PCR 的结果显示, 烟曲霉菌感染 RAW264.7 细胞组中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和趋化因子 CCL-2 表达量都较正常组有明显升高, 差异均有显著统计学意义(图 1(b)~(e)), 说明烟曲霉菌诱导了 RAW264.7 中炎症的发生。与烟曲霉菌感染组相比, TTP siRNA 加菌感染组中的炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和趋化因子 CCL-2 的 mRNA 表达水平显著升高(图 3(a)、图 3(c) & 图 3(d)), 差异有统计学意义; 而炎症因子 TNF- α 的 mRNA 表达水平无明显变化(图 3(b))。说明 TTP 可以抑制烟曲霉菌诱导的炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和趋化因子 CCL-2 的产生, 减轻炎症反应。

4. 讨论

真菌性角膜炎在世界范围内通常是一种难治性且具有挑战性的眼科疾病[27] [28]。炎症是针对入侵病原体或组织损伤的免疫反应的重要组成部分。病原体相关模式(PAMP)通常识别巨噬细胞模式识别受体(PRR)构成机体防御的第一道防线[29] [30], 同样, 组织损伤通过损伤相关分子模式(DAMP)激活 PRR, 迅速募集嗜中性粒细胞, 这些嗜中性粒细胞是促炎反应的先锋[31] [32] [33], 从而引发局部炎症反应。虽然炎症反应对清除病原体、增强机体抵抗力起到有利的作用, 但持续的高反应性炎症环境导致过度的组

织损伤，加重疾病的进展。然而，目前临床上仍缺乏安全有效的治疗药物，导致真菌性角膜炎导致的角膜穿孔率比细菌性角膜炎高 5 至 6 倍，因此迫切需要找到治疗此类疾病的新方法。



注：(a)~(d)下调 TTP 的表达烟曲霉菌感染 RAW264.7 细胞 9 h，细胞中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和趋化因子 CCL-2 的 mRNA 表达水平显著升高，TNF- α 的 mRNA 表达水平无明显变化(*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ns 差异无统计学意义)

Figure 3. The effect of TTP on inflammatory factors IL-1 β , TNF- α , IL-6 and chemokine CCL-2 in RAW264.7 cells induced by *Aspergillus fumigatus*

图 3. TTP 对烟曲霉菌诱导的 RAW264.7 细胞中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和趋化因子 CCL-2 的影响

TTP 存在于大多数真核生物中，是一种核质蛋白，可结合细胞质中含有 ARE 的 mRNA 并促进其降解，是重要的抗炎和促分解因子[34] [35] [36]，在细胞代谢、基因表达、炎症、癌症中发挥重要作用[37]。TTP 所具备的抗炎作用已在多种疾病模型中被证实，例如 TTP 基因敲除小鼠会出现严重的关节炎、自身免疫、恶病质、皮炎和骨髓增生综合症[15]；在慢性阻塞性肺疾病中，TTP 通过降低促炎细胞因子和趋化因子的表达，减少中性粒细胞的募集，进而在抑制香烟烟雾诱导的肺部炎症、气道重塑、肺气肿和肺功

能受损方面发挥着重要作用[38];在模拟的炎症性关节炎模型中,当TTP表达受到抑制时,MSU晶体处理的J774A.1细胞中IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、COX-2和iNOS的mRNA表达相应增加[39]。我们的研究结果证实,TTP在烟曲霉菌菌丝刺激的RAW264.7细胞中表达,且在感染9h后出现表达高峰。烟曲霉菌成功诱导的RAW264.7细胞中IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、CCL-2的基因表达升高,引发炎症反应,干扰TTP表达后可使炎症因子IL-1 β 、IL-6及趋化因子CCL-2表达增加,表明在炎症反应过程中,TTP可以抑制RAW264.7细胞中炎症因子的表达,减轻炎症反应,发挥抗炎作用。

5. 结论

综上所述,本实验证实了TTP在真菌性角膜炎中的抗炎作用与其抑制下游炎症因子及趋化因子表达有关。但是,关于TTP在真菌性角膜炎中发挥抗炎作用的具体机制尚未明确,我们会针对其发挥抗炎作用的具体机制进行更加深入的研究。为TTP作为治疗真菌性角膜炎的新靶点奠定基础。

参考文献

- [1] Maharana, P.K., *et al.* (2016) Recent Advances in Diagnosis and Management of Mycotic Keratitis. *Indian Journal of Ophthalmology*, **64**, 346-357. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.185592>
- [2] Shah, A., Sachdev, A., Coggon, D. and Hossain, P. (2011) Geographic Variations in Microbial Keratitis: An Analysis of the Peer-Reviewed Literature. *British Journal of Ophthalmology*, **95**, 762-767. <https://doi.org/10.1136/bjo.2009.169607>
- [3] Thomas, P.A., Leck, A.K. and Myatt, M. (2005) Characteristic Clinical Features as an Aid to the Diagnosis of Suppurative Keratitis Caused by Filamentous Fungi. *British Journal of Ophthalmology*, **89**, 1554-1558. <https://doi.org/10.1136/bjo.2005.076315>
- [4] Ali Shah, S.I., *et al.* (2017) Visual Outcome in Patients of Keratomycosis, at a Tertiary Care Centre in Larkana, Pakistan. *Journal of Pakistan Medical Association*, **67**, 1035-1038.
- [5] De Lucca, A.J. (2007) Harmful Fungi in both Agriculture and Medicine. *Revista Iberoamericana de Micología*, **24**, 3-13. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(07\)70002-5](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70002-5)
- [6] Thomas, P.A. (2003) Current Perspectives on Ophthalmic Mycoses. *Clinical Microbiology Reviews*, **16**, 730-797. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.730-797.2003>
- [7] Bhartiya, P., Daniell, M., Constantinou, M., Islam, F.A. and Taylor, H.R. (2007) Fungal Keratitis in Melbourne. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, **35**, 124-130. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2006.01405.x>
- [8] 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)
- [9] Wells, C.A., *et al.* (2008) The Macrophage-Inducible C-Type Lectin, Mincle, Is an Essential Component of the Innate Immune Response to *Candida albicans*. *The Journal of Immunology*, **180**, 7404-7413. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.11.7404>
- [10] Becker, M.J., *et al.* (2003) Effect of Amphotericin B Treatment on Kinetics of Cytokines and Parameters of Fungal Load in Neutropenic Rats with Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**, 428-434. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg367>
- [11] Bianconi, V., Sahebkar, A., Atkin, S.L. and Pirro, M. (2018) The Regulation and Importance of Monocyte Chemoattractant Protein-1. *Current Opinion in Hematology*, **25**, 44-51. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000389>
- [12] Lee, W.-B., *et al.* (2012) Neutrophils Promote Mycobacterial Trehalose Dimycolate-Induced Lung Inflammation via the Mincle Pathway. *PLOS Pathogens*, **8**, e1002614. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002614>
- [13] Kolaczowska, E. and Kubes, P. (2013) Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation. *Nature Reviews Immunology*, **13**, 159-175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>
- [14] Lai, W.S., *et al.* (1999) Evidence That Tristetraprolin Binds to AU-Rich Elements and Promotes the Deadenylation and Destabilization of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 4311-4323. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.6.4311>
- [15] Patial, S. and Blackshear, P.J. (2016) Tristetraprolin as a Therapeutic Target in Inflammatory Disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, **37**, 811-821. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.07.002>
- [16] Patial, S., *et al.* (2016) Enhanced Stability of Tristetraprolin mRNA Protects Mice against Immune-Mediated Inflammation.

- matory Pathologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, 1865-1870. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519906113>
- [17] Rappal, P., Brüne, B. and Schmid, T. (2021) Role of Tristetraprolin in the Resolution of Inflammation. *Biology*, **10**, Article No. 66. <https://doi.org/10.3390/biology10010066>
- [18] Saini, Y., Chen, J. and Patial, S. (2020) The Tristetraprolin Family of RNA-Binding Proteins in Cancer: Progress and Future Prospects. *Cancers*, **12**, Article No. 1539. <https://doi.org/10.3390/cancers12061539>
- [19] Cao, Y., *et al.* (2021) ZFP36 Protects Lungs from Intestinal I/R-Induced Injury and Fibrosis through the CREBBP/p53/p21/Bax Pathway. *Cell Death & Disease*, **12**, Article No. 685. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03950-y>
- [20] Yin, J., *et al.* (2018) Neuroprotective Effect of Protein Phosphatase 2A/Tristetraprolin Following Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Frontiers in Neuroscience*, **12**, Article 96. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00096>
- [21] Park, J.M., Lee, T.H. and Kang, T.H. (2018) Roles of Tristetraprolin in Tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, Article No. 3384. <https://doi.org/10.3390/ijms19113384>
- [22] Stumpo, D.J., *et al.* (2016) Deficiency of the Placenta- and Yolk Sac-Specific Tristetraprolin Family Member ZFP36L3 Identifies Likely mRNA Targets and an Unexpected Link to Placental Iron Metabolism. *Development*, **143**, 1424-1433. <https://doi.org/10.1242/dev.130369>
- [23] Farina, C., Aloisi, F. and Meinl, E. (2007) Astrocytes Are Active Players in Cerebral Innate Immunity. *Trends in Immunology*, **28**, 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.01.005>
- [24] Filous, A.R. and Silver, J. (2016) Targeting Astrocytes in CNS Injury and Disease: A Translational Research Approach. *Progress in Neurobiology*, **144**, 173-187. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.03.009>
- [25] Astakhova, A.A., Chistyakov, D.V., Sergeeva, M.G. and Reiser, G. (2018) Regulation of the ARE-Binding Proteins, TTP (Tristetraprolin) and HuR (Human Antigen R), in Inflammatory Response in Astrocytes. *Neurochemistry International*, **118**, 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.04.014>
- [26] Xu, B., *et al.* (2020) Regulated Tristetraprolin Overexpression Dampens the Development and Pathogenesis of Experimental Autoimmune Uveitis. *Frontiers in Immunology*, **11**, Article 583510. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583510>
- [27] Keay, L.J., *et al.* (2011) Clinical and Microbiological Characteristics of Fungal Keratitis in the United States, 2001-2007: A Multicenter Study. *Ophthalmology*, **118**, 920-926. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2010.09.011>
- [28] Prajna, N.V., *et al.* (2016) Effect of Oral Voriconazole on Fungal Keratitis in the Mycotic Ulcer Treatment Trial II (MUTT II): A Randomized Clinical Trial. *JAMA Ophthalmology*, **134**, 1365-1372. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2016.4096>
- [29] Ibrahim, Z.A., Armour, C.L., Phipps, S. and Sukkar, M.B. (2013) RAGE and TLRs: Relatives, Friends or Neighbours? *Molecular Immunology*, **56**, 739-744. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.07.008>
- [30] Zhang, X. and Mosser, D.M. (2008) Macrophage Activation by Endogenous Danger Signals. *The Journal of Pathology*, **214**, 161-178. <https://doi.org/10.1002/path.2284>
- [31] Kienle, K. and Lämmermann, T. (2016) Neutrophil Swarming: An Essential Process of the Neutrophil Tissue Response. *Immunological Reviews*, **273**, 76-93. <https://doi.org/10.1111/imr.12458>
- [32] Uderhardt, S., Martins, A.J., Tsang, J.S., Lämmermann, T. and Germain, R.N. (2019) Resident Macrophages Cloak Tissue Microlesions to Prevent Neutrophil-Driven Inflammatory Damage. *Cell*, **177**, 541-555. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.028>
- [33] Prame Kumar, K., Nicholls, A.J. and Wong, C.H.Y. (2018) Partners in Crime: Neutrophils and Monocytes/Macrophages in Inflammation and Disease. *Cell and Tissue Research*, **371**, 551-565. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2753-2>
- [34] Brook, M., *et al.* (2006) Posttranslational Regulation of Tristetraprolin Subcellular Localization and Protein Stability by p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathways. *Molecular and Cellular Biology*, **26**, 2408-2418. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.6.2408-2418.2006>
- [35] Brooks, S.A. and Blackshear, P.J. (2013) Tristetraprolin (TTP): Interactions with mRNA and Proteins, and Current Thoughts on Mechanisms of Action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, **1829**, 666-679. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.02.003>
- [36] Kratochvill, F., *et al.* (2011) Tristetraprolin-Driven Regulatory Circuit Controls Quality and Timing of mRNA Decay in Inflammation. *Molecular Systems Biology*, **7**, Article No. 560. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.93>
- [37] Rodríguez-Gómez, G., *et al.* (2021) Tristetraprolin: A Cytosolic Regulator of mRNA Turnover Moonlighting as Transcriptional Corepressor of Gene Expression. *Molecular Genetics and Metabolism*, **133**, 137-147. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.03.015>

-
- [38] Nair, P.M., *et al.* (2019) Enhancing Tristetraprolin Activity Reduces the Severity of Cigarette Smoke-Induced Experimental Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clinical & Translational Immunology*, **8**, e01084. <https://doi.org/10.1002/cti2.1084>
- [39] Lv, L., *et al.* (2021) Targeting Tristetraprolin Expression or Functional Activity Regulates Inflammatory Response Induced by MSU Crystals. *Frontiers in Immunology*, **12**, Article 675534. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.675534>