

红细胞膜仿生纳米颗粒通过减轻炎症反应在真菌性角膜炎中发挥保护作用

侯亚鑫¹, 刘 星¹, 林 静^{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: 2024年4月29日; 录用日期: 2024年5月21日; 发布日期: 2024年5月31日

摘 要

目的: 探究红细胞膜仿生纳米颗粒在真菌性角膜炎中的保护作用及机制。方法: 首先通过角膜荧光素钠染色实验探究红细胞膜仿生纳米颗粒对小鼠角膜的毒性。在体内, 用烟曲霉菌孢子感染C57BL/6小鼠角膜, 构建烟曲霉菌性角膜炎小鼠模型, 用PBS或者红细胞膜仿生纳米颗粒处理, 用裂隙灯显微镜拍摄感染后1、3、5天角膜照片并进行临床评分, 用RT-PCR检测感染后第3天角膜TNF- α 、CCL-2的mRNA表达。在体外, 用烟曲霉菌菌丝刺激HCECs后, 用红细胞膜仿生纳米颗粒处理, 通过RT-PCR检测HCECs中TNF- α 、CCL-2的mRNA表达。结果: 红细胞膜仿生纳米颗粒对小鼠角膜安全无毒, 点眼后角膜未出现荧光素钠染色。较PBS对照组相比, 红细胞膜仿生纳米颗粒组小鼠角膜溃疡程度显著减轻, 炎症反应水平下降。红细胞膜仿生纳米颗粒降低TNF- α 、CCL-2的mRNA表达。结论: 红细胞膜仿生纳米颗粒通过减轻炎症反应在烟曲霉菌性角膜炎中发挥保护作用。

关键词

红细胞膜仿生纳米颗粒, 聚乳酸羟基乙酸, 烟曲霉菌性角膜炎, 炎症

Red Blood Cell Membrane-Camouflaged Biomimetic Nanoparticle Plays a Protective Role in Fungal Keratitis by Reducing the Inflammatory Response

Yaxin Hou¹, Xing Liu¹, Jing Lin^{2*}

¹Medical College, Qingdao University, Qingdao Shandong

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

*通讯作者。

文章引用: 侯亚鑫, 刘星, 林静. 红细胞膜仿生纳米颗粒通过减轻炎症反应在真菌性角膜炎中发挥保护作用[J]. 临床医学进展, 2024, 14(5): 2375-2383. DOI: 10.12677/acm.2024.1451696

Abstract

Objective: To explore the protective effect and mechanism of red blood cell membrane-camouflaged biomimetic nanoparticle on fungal keratitis. **Methods:** Firstly, the toxicity of red blood cell membrane-camouflaged biomimetic nanoparticle to the cornea of mice was investigated by and corneal fluorescein sodium staining experiment. *In vivo*, a mouse model of *Aspergillus fumigatus* keratitis was constructed by infecting the corneas of C57BL/6 mice with *Aspergillus fumigatus* spores and treated with PBS or red blood cell membrane-camouflaged biomimetic nanoparticle. The photos of the corneas were taken with slit lamp microscope at 1, 3 and 5 days after infection and clinical scores were performed. Meanwhile, PT-PCR was used to detect the mRNA expression of TNF- α and CCL-2 in cornea on day 3 after infection. Then, *in vitro*, the HCECs were infected with *Aspergillus fumigatus* and treated with red blood cell membrane-camouflaged biomimetic nanoparticle. And RT-PCR was used to detect the mRNA expression of TNF- α and CCL-2 in HCECs. **Results:** The red blood cell membrane-camouflaged biomimetic nanoparticle was safe and non-toxic to mouse corneas, and there was no sodium fluorescein staining was observed in corneas after implantation. Compared with PBS control group, the red blood cell membrane-camouflaged biomimetic nanoparticle group significantly reduced the degree of corneal ulcer and the level of inflammation. Meanwhile, the red blood cell membrane-camouflaged biomimetic nanoparticle could decrease the mRNA expression of TNF- α and CCL-2. **Conclusion:** The red blood cell membrane-camouflaged biomimetic nanoparticle plays a protective role in *Aspergillus fumigatus* keratitis by reducing inflammatory response.

Keywords

Red Blood Cell Membrane-Camouflaged Biomimetic Nanoparticle, PLGA, *Aspergillus fumigatus* Keratitis, Inflammatory

Copyright © 2024 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

真菌性角膜炎是由曲霉菌和镰刀菌等致病真菌感染引起的感染性角膜疾病，是发展中国家常见的严重致盲性眼病之一[1] [2]。近年来，由于隐形眼镜的频繁使用、抗生素和激素的滥用和角膜表面手术的增多，真菌性角膜炎的发病率呈上升趋势[3] [4]。角膜炎症及其相关并发症是真菌性角膜炎视力障碍的主要原因，过度的炎症反应诱导免疫细胞的聚集，促进促炎细胞因子的产生，导致角膜损伤甚至穿孔[5] [6]。目前，真菌性角膜炎的治疗仍由局部应用抗真菌药物为主，现有抗真菌药物存在溶解度差、生物利用度低、组织渗透性差、眼表毒性大等缺点[7] [8] [9]。并且难以解决角膜过度炎症反应造成的角膜组织损伤[9]。因此，需要探索安全性高、能够有效减轻真菌性角膜炎炎症反应的方法。

近年来，细胞膜包被的仿生纳米颗粒由于保留了细胞膜表面特异性蛋白，发挥出良好的生物相容性及较低的免疫原性受到研究者的广泛关注[10] [11]。红细胞是人体含量最丰富的血细胞，且成熟红细胞没有细胞核、细胞器等结构[12]。由于其高生物相容性、低毒性、优异的可获得性和可操作性被广泛用作药

物递送载体[12] [13]。聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)是一种聚酯, 由于具有良好的生物相容性和生物降解性而被应用于纳米递药系统, 可以增加药物的缓释效果和稳定性[14] [15]。目前, 红细胞膜仿生-PLGA 纳米递药系统应用在肿瘤、炎症的治疗中, 可以增加药物的治疗作用、减轻毒副作用[16] [17]。然而其在真菌性角膜炎中的作用未见报道。本研究探究了红细胞膜仿生 PLGA 纳米颗粒(RBCm@PLGA)对烟曲霉菌性角膜炎炎症反应及严重程度的影响。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

PLGA (50:50)购买于中国济南戴钢生物材料有限公司。沙氏培养基、磷酸盐缓冲液粉末(PBS)、乙二胺四乙酸(EDTA)、牛血清白蛋白(BSA)购买于中国北京索莱宝公司。二氯甲烷(500 mL)购买于上海生物工程股份有限公司。三氯甲烷(氯仿, 500 mL)购买于青岛捷隆化工有限公司, DEPC 水(100 mL)购买于上海生物工程有限公司。脂质体挤出器购买于美国 Avanti 公司。实验动物 C57BL/6 小鼠(雌性, 8 周龄)购买于济南彭悦实验动物有限公司, 所有动物实验均符合 ARVO 眼科和视觉研究动物使用声明。人角膜上皮细胞(HCECs)由厦门大学(中国厦门)实验室提供。实验用烟曲霉菌为中国普通微生物菌种保藏管理中心(中国北京)烟曲霉菌 3.0772 菌株。

2.2. 实验方法

2.2.1. RBCm@PLGA 的制备

从 C57BL/6 小鼠眶静脉取全血, 并在每毫升血液中加入 1.5 mg EDTA 抗凝。在 4℃ 下 3000 rpm 离心 5 min 后去除上层的血浆及白细胞等成分, 将下层红细胞用 1 × PBS 溶液洗涤 3 次后再次离心收集沉淀。在获得的红细胞沉淀中加入 0.25 × PBS, 并置于 4℃ 冰箱中使红细胞低渗涨破。12 h 后, 在 4℃ 下 14,000 rpm 离心 10 min, 收集沉淀并用 1 × PBS 洗涤 2 次。将洗涤后的沉淀用双蒸水重悬, 并用脂质体挤出器依次通过 400 nm、200 nm 的聚碳酸酯多孔膜连续挤出。

将 250 mg PLGA 溶解在 10 mL 二氯甲烷中形成油相, 随后逐滴滴加到 30 mL 4% 的 BSA 溶液中, 用探头超声仪 300 W, 启动 3 s, 停止 2 s 超声 1 min。将超声后的溶液在室温下用磁力搅拌器搅拌过夜。将剩余溶液在 4℃ 下 14,000 rpm 离心 10 min, 收集沉淀并用 1 × PBS 洗涤 3 次。将洗涤后的沉淀用双蒸水重悬后在真空冷冻干燥机中冻干。

将冻干后的粉末与红细胞膜按照 10:1 的质量比混合, 用探头超声仪超声 1 min 超声使其充分混匀。用脂质体挤出器依次通过 400 nm、200 nm、100 nm 的聚碳酸酯多孔膜连续挤出 20 次后用真空冷冻干燥机冻干, 将获得的 RBCm@PLGA 粉末保存在-80℃冰箱中。

2.2.2. 角膜荧光素钠染色

采用角膜荧光素钠染色法研究 RBCm@PLGA 对正常小鼠角膜的毒性作用。将 PLGA 和 RBCm@PLGA 用 PBS 配成 250 μg/mL 的混悬液。将 5 μL 混悬液滴入 C57BL/6 小鼠单眼, 每天 3 次, PBS 处理的对侧眼作为对照(n = 3/组/次)。在小鼠角膜灌注后 1、3 和 5 天, 在钴蓝光下使用裂隙灯显微镜检查角膜荧光素染色情况。

2.2.3. 烟曲霉菌培养及孢子、灭活菌丝的收集

在无菌操作台中将 50 μL 烟曲霉菌 3.0772 菌株接种于沙氏固体培养基中, 在 37℃ 恒温箱中培养 3~5 天后, 在无菌操作台中, 用含有 0.1% Tween20 的无菌 PBS 缓冲液冲洗并收集分生孢子。在 4℃ 下 12,000 g 离心 5 min 后弃上清, 重悬后得到分生孢子悬液, 将其放置在 4℃ 冰箱中保存备用。

将烟曲霉菌 3.0772 菌株接种于含有 300 mL 无菌沙氏液体培养基的烧瓶中, 将烧瓶置于恒温摇床培养箱中在 37℃ 下 120 rpm 摇菌培养。当真菌生长至团块状时, 在无菌操作台中收集真菌团块并用无菌研磨棒物理研磨。将研磨后的菌丝置于离心管中, 在 4℃ 下 5000 rpm 离心 15 min, 收集沉淀并用无菌 PBS 洗涤 3 次。在洗涤后的沉淀中加入 75%酒精, 在 4℃ 冰箱中过夜灭活, 灭活后再次离心弃上清, 用无菌 PBS 洗涤 3 次。将菌丝用高糖型细胞培养液(DMEM)重悬并稀释成 1×10^8 CFU/mL 的灭活菌丝悬液。

2.2.4. 烟曲霉菌性角膜炎小鼠模型的建立

将 C57BL/6 小鼠用 8%水合氯醛(0.4 mL/kg)腹腔麻醉后, 在显微镜下用微注射器(10 μL)在小鼠右眼角膜基质注射 2.5 μL 浓度为 3×10^7 /mL 的烟曲霉菌分生孢子悬液, 左眼为空白对照组。将小鼠随机分为空白对照组、PLGA 处理组和 RBCm@PLGA 处理组, 分别用 10 μL PBS、PLGA (250 μg/mL)和 RBCm@PLGA (250 μg/mL)点眼处理, 每天 4 次。在处理第 1、3、5 天用裂隙灯显微镜拍照观察小鼠角膜的病变情况并进行临床评分。临床评分按照之前的标准[18]。收集处理后第 3 天的小鼠角膜, 用于聚合酶链式反应(RT-PCR)实验检测其 TNF-α 及 CCL-2 的 mRNA 表达水平。

2.2.5. HCECs 培养和处理

将 HCECs 接种于 6 孔板中, 在 37℃ 恒温箱中培养 48 h, 用浓度为 5×10^6 灭活的烟曲霉菌菌丝刺激 1 h 后, 加入 PBS、PLGA 或 RBCm@PLGA 处理。在感染后 8 h 收集细胞进行 RT-PCR 实验检测其 TNF-α 及 CCL-2 的 mRNA 表达水平。

2.2.6. RT-PCR

将组织破碎仪破碎后的小鼠角膜组织或者 HCECs 中加入 RNA 裂解液并置于冰盒上裂解 30 min。4℃ 下 12,000 rpm 离心 5 min 后吸取上清液至新的 EP 管中, 在 EP 管中加入 1/5 体积的氯仿, 充分混匀后在室温下放置 5 min。4℃ 下 12,000 rpm 离心 15 min, 吸取上清液至新的 EP 管中。在上清液中加入等体积异丙醇, 充分混匀后在室温下放置 10 min。4℃ 下 12,000 rpm 离心 10 min 后缓慢倒出上清液收集 RNA 沉淀。500 μL 75%酒精洗涤后再次离心弃上清后, 室温放置使酒精完全挥发。用 10 μL DEPC 水溶解 RNA 沉淀, 充分混匀后立即用核酸蛋白分析仪测定 RNA 的纯度及含量。RNA 样品使用 HiScript III RT SuperMix (Vazyme, 南京, 中国)进行逆转录, 生成 cDNA 模板。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	Gen Bank
Mouse β-actin	F	5'-GATTACTGCTCTGGCTCCTAGC-3'	NM_007393.5
	R	5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGC-3'	
Mouse TNF-α	F	5'-ACC CTC ACA CTC AGA TCA TCT T-3'	NM_013693.3
	R	5'-GGT TGT CTT TGA GAT CCA TGC-3'	
Mouse CCL-2	F	5'-CAGCAGGTGTCCCAAAGAAG-3'	NM_011333
	R	5'-ATTTGGTTCCGATCCAGGTT-3'	
Human GAPDH	F	5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3'	NM_001101.5
	R	5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'	
Human TNF-α	F	5'-CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG-3'	NM_000594
	R	5'-ATGGGCTACAGGCTTGCTACTC-3'	
Human CCL-2	F	5'-AGAATCACCAGCAGCAAGTGTCC-3'	NM_002982
	R	5'-TCCTGAACCCACTTCTGCTTGG-3'	

F: forward; R: reverse.

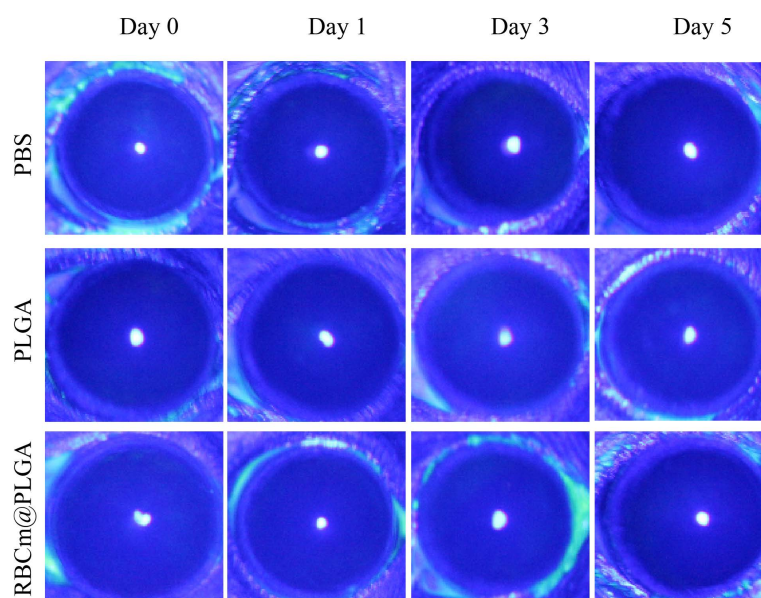
2.3. 统计学方法

采用 GraphPad 8.0 软件进行数据分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较采用单因素方差分析, 其中的两两比较采用 LSD-t 检验, 结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$)。NS 表示差异无统计学差异。所有实验均重复至少 3 次。

3. 结果

3.1. RBCm@PLGA 对小鼠角膜上皮细胞无毒性

为了评估 RBCm@PLGA 的毒性, 采用角膜荧光素钠染色的方法检测 PLGA 和 RBCm@PLGA 对小鼠角膜上皮细胞的损伤情况(图 1)。结果表明与正常对照组相比, PLGA 和 RBCm@PLGA 点眼后小鼠角膜均无明显荧光素钠染色, 说明 PLGA 和 RBCm@PLGA 不会损伤角膜上皮细胞, 有良好的生物安全性。



注: PLGA 和 RBCm@PLGA 点眼后, 小鼠角膜的荧光素钠染色照片, 与正常对照组相比, 各治疗组在点眼后 1, 3, 5 天均无明显荧光素钠染色。

Figure 1. Toxicity of RBCm@PLGA to corneal epithelial cells

图 1. RBCm@PLGA 对角膜上皮细胞的毒性

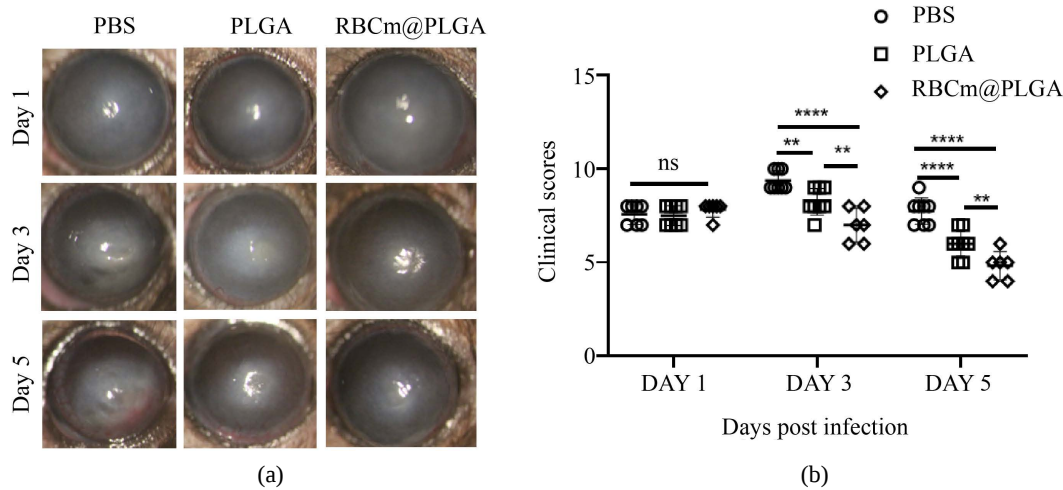
3.2. RBC@PLGA 降低小鼠真菌性角膜炎的严重程度和临床评分

我们构建了小鼠烟曲霉菌性角膜炎模型, 并用 PLGA 和 RBCm@PLGA 点眼治疗, 感染后 1、3、5 天在裂隙灯下观察并拍照。结果显示, 与 PBS 对照组相比, PLGA 和 RBCm@PLGA 处理后, 小鼠角膜的浑浊程度减轻, 溃疡面积减小(图 2(a))。感染后第 3 天和第 5 天, PLGA 和 RBCm@PLGA 处理组临床评分较 PBS 对照组显著降低(图 2(b))。

3.3. RBC@PLGA 降低烟曲霉菌性角膜炎小鼠角膜中促炎因子的表达

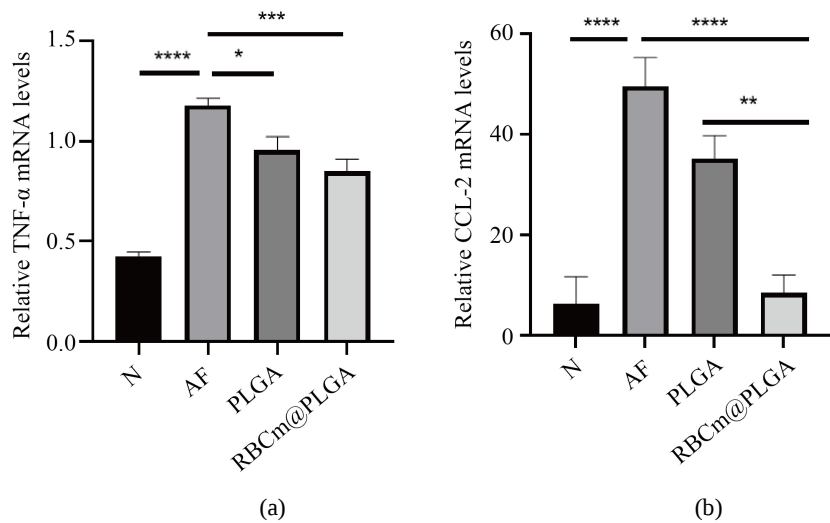
为了进一步评估 RBCm@PLGA 在体内对炎症反应的影响, 我们用 RT-PCR 检测了烟曲霉菌感染 3 天后小鼠角膜中促炎因子 TNF- α (图 3(a))和 CCL-2 (图 3(b)) mRNA 的表达。结果表明, 与正常对照组相比, 烟曲霉菌感染后第 3 天小鼠角膜组织中 TNF- α 和 CCL-2 mRNA 的表达量显著升高($P < 0.0001$)。与

AF 组比较, RBCm@PLGA 处理 3 d 后, TNF- α 和 CCL-2 mRNA 水平均明显受到抑制($P < 0.001$, $P < 0.0001$)。



注: 烟曲霉菌感染后 1、3、5 天, PBS、PLGA 和 RBCm@PLGA 治疗组小鼠角膜的眼前节照相(a)与临床评分(b)。与 PBS 组相比, PLGA 和 RBCm@PLGA 减轻了小鼠角膜炎的严重程度和临床评分, 差异有统计学意义($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$, ns 表示差异无统计学差异)。

Figure 2. RBCm@PLGA alleviates the severity of *Aspergillus fumigatus* keratitis in mice
图 2. RBCm@PLGA 减轻小鼠烟曲霉菌性角膜炎的严重程度



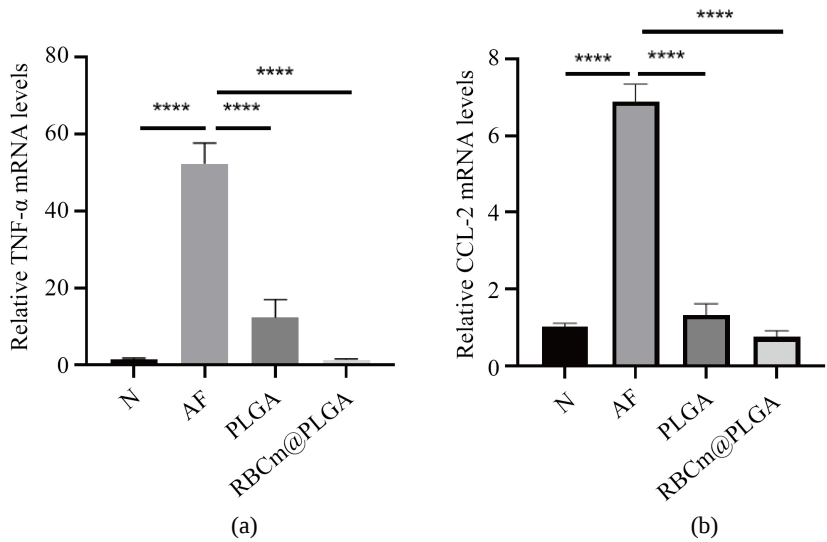
注: PLGA 和 RBCm@PLGA 处理对烟曲霉菌感染后第 3 天小鼠角膜组织中 TNF- α (A)和 CCL-2 (B) mRNA 水平的影响。与 AF 组比较, RBCm@PLGA 处理后, TNF- α 和 CCL-2 mRNA 表达量降低, 差异有统计学意义。($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$)。

Figure 3. RBCm@PLGA decreased the mRNA expression of proinflammatory factor in the cornea of mice infected by *Aspergillus fumigatus*
图 3. RBCm@PLGA 降低烟曲霉菌感染后小鼠角膜中促炎因子 mRNA 的表达

3.4. RBC@PLGA 抑制烟曲霉菌刺激后 HCECs 中促炎因子的表达

我们检测了 PLGA 和 RBCm@PLGA 对烟曲霉菌刺激后 HCECs 中促炎因子 TNF- α 和 CCL-2 的表达

水平(图 4(a), 图 4(b))。RT-PCR 结果显示, 与未感染组相比, 烟曲霉菌刺激后 HCECs 中 TNF- α 和 CCL-2 的 mRNA 表达升高($P < 0.0001$)。与 AF 组相比, PLGA 和 RBCm@PLGA 可以显著下调 TNF- α 和 CCL-2 的表达($P < 0.0001$)。



注: PLGA 和 RBCm@PLGA 处理对烟曲霉菌感染后 HCECs 细胞中 TNF- α (a)和 CCL-2 (b) mRNA 水平的影响。与 AF 组相比, PLGA 和 RBCm@PLGA 处理后 TNF- α 和 CCL-2 的 mRNA 水平降低, 差异具有统计学意义(**** $P < 0.0001$)。

Figure 4. Effects of PLGA and RBCm@PLGA on the inflammatory response of HCECs

图 4. PLGA 和 RBCm@PLGA 对 HCECs 炎症反应的影响

4. 讨论

真菌性角膜炎可以引起严重的角膜损伤, 调查显示, 每年全球有 100 多万人新感染真菌性角膜炎, 是世界范围内重要的致盲性眼病[19]。根据世界卫生组织 2001 年的调查显示, 角膜盲是继白内障之后的第二大失明原因[20]。而眼外伤和角膜溃疡是角膜失明的重要原因。当致病真菌侵入角膜后, 会在角膜定植、生长、繁殖, 会导致眼睑水肿、结膜充血、角膜上皮缺损及潜在基质浸润、前房积脓, 随着病情进展, 可能会出现角膜溃疡及眼内眼[21] [22], 严重损害视力, 影响患者的生活质量。目前, 临床应用的抗真菌药物溶解性差、药物利用率低, 且缺乏抗炎作用[23] [24], 真菌性角膜炎的治疗仍十分棘手。

角膜上皮是角膜的最外层, 是直接保护眼睛免受病原体入侵的主要结构屏障。目前应用的抗真菌滴眼液具有眼表毒性, 并且临床应用时往往需要长期给药, 频繁点药会损伤角膜上皮细胞, 导致眼表刺激症状, 降低患者的依从性[25]。Su 等人[26]的研究开发了一种红细胞膜伪装的 PLGA 纳米颗粒递送三氧化二砷由于治疗急性早幼粒细胞白血病, 可以降低三氧化二砷对肾脏细胞的毒性。本研究发现, 在点眼后第 1、3、5 天 PBS、PLGA 和 RBCm@PLGA 组角膜均未见荧光素钠染色, 表明 RBCm@PLGA 对角膜上皮细胞无毒性, 具有良好的生物安全性。

固有免疫是机体抵御病原体入侵的重要防线。当角膜被感染时, 正常免疫监测可以激活巨噬细胞和中性粒细胞等免疫细胞, 介导角膜上皮细胞和免疫细胞的炎症反应, 促进炎症细胞浸润及炎症细胞因子产生, 有效识别和吞噬真菌[27] [28]。但是, 随着炎症级联逐渐增加, 许多信号被放大。最后, 强烈且持续的免疫反应会导致角膜混浊甚至穿孔[29] [30]。因此, 抑制真菌性角膜炎中过度的炎症反应对于改善角膜炎预后具有重要意义。体内实验表明, RBCm@PLGA 治疗后, 烟曲霉菌性角膜炎小鼠角膜的浑浊程度

减轻、溃疡面积减小、临床评分降低,表明 RBCm@PLGA 对真菌性角膜炎具有保护作用。我们的研究检测了 RBCm@PLGA 对烟曲霉菌感染后 HCECs 细胞和小鼠角膜中促炎因子 TNF- α 和 CCL-2 mRNA 水平的影响,结果表明 RBCm@PLGA 可降低促炎因子的表达减轻角膜炎症反应。

综上所述,RBCm@PLGA 具有良好的生物安全性,可以减轻促炎因子的表达抑制炎症反应在真菌性角膜炎中发挥保护作用,为真菌性角膜炎的治疗提供新的思路。

5. 问题与展望

RBCm@PLGA 具有抗炎作用,可以通过减轻炎症反应在真菌性角膜炎中发挥保护作用。但临床应用的具体浓度、频次等还需要进一步实验来摸索。RBCm@PLGA 本身没有抗真菌作用,在临床应用中需要与抗真菌药物联合应用。后续研究中我们可以用 RBCm@PLGA 负载抗真菌药物使其同时发挥抗菌和抗炎的双重效果。总之,作为一种新兴的递药系统,RBCm@PLGA 具有广阔的应用前景,为真菌性角膜炎的治疗提供新方向。

参考文献

- [1] Donovan, C., Arenas, E., Ayyala, R.S., *et al.* (2022) Fungal Keratitis: Mechanisms of Infection and Management Strategies. *Survey of Ophthalmology*, **67**, 758-769. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2021.08.002>
- [2] Jiang, N., Zhao, G., Lin, J., Hu, L., *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>
- [3] Hoffman, J.J., Burton, M.J. and Leck, A. (2021) Mycotic Keratitis—A Global Threat from the Filamentous Fungi. *Journal of Fungi*, **7**, Article 273. <https://doi.org/10.3390/jof7040273>
- [4] Liu, X., Sui, J., Li, C., *et al.* (2023) The Preparation and Therapeutic Effects of β -Glucan-Specific Nanobodies and Nanobody-Natamycin Conjugates in Fungal Keratitis. *Acta Biomaterialia*, **169**, 398-409. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.08.019>
- [5] Yang, H., Wang, Q., Han, 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 106118. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106118>
- [6] Wang, Y., Yin, M., Gu, L., *et al.* (2023) The Therapeutic Role and Mechanism of 4-Methoxycinnamic Acid in Fungal Keratitis. *International Immunopharmacology*, **116**, Article 109782. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.109782>
- [7] Austin, A., Lietman, T. and Rose-Nussbaumer, J. (2017) Update on the Management of Infectious Keratitis. *Ophthalmology*, **124**, 1678-1689. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.05.012>
- [8] Luan, S., Peng, X., Lin, J., *et al.* (2022) Gallic Acid Ameliorates *Aspergillus fumigatus* Keratitis through Reducing Fungal Load and Suppressing the Inflammatory Response. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **63**, 12. <https://doi.org/10.1167/iovs.63.12.12>
- [9] Lakhani, P., Patil, A. and Majumdar, S. (2019) Challenges in the Polyene- and Azole-Based Pharmacotherapy of Ocular Fungal Infections. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, **35**, 6-22. <https://doi.org/10.1089/jop.2018.0089>
- [10] Huang, Y., Gao, X. and Chen, J. (2018) Leukocyte-Derived Biomimetic Nanoparticulate Drug Delivery Systems for Cancer Therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **8**, 4-13. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.12.001>
- [11] Ihler, G.M., Glew, R.H. and Schnure, F.W. (1973) Enzyme Loading of Erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **70**, 2663-2666. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.9.2663>
- [12] Xia, Q., Zhang, Y., Li, Z., *et al.* (2019) Red Blood Cell Membrane-Camouflaged Nanoparticles: A Novel Drug Delivery System for Antitumor Application. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **9**, 675-689. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.01.011>
- [13] Yu, H., Yan, J., Li, Z., *et al.* (2023) Enhanced Photothermal-Ferroptosis Effects Based on RBCm-Coated PDA Nanoparticles for Effective Cancer Therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, **11**, 415-429. <https://doi.org/10.1039/D2TB02329F>
- [14] McCall, R.L. and Sirianni, R.W. (2013) PLGA Nanoparticles Formed by Single- or Double-Emulsion with Vitamin E-TPGS. *Journal of Visualized Experiments*, **82**, Article 51015. <https://doi.org/10.3791/51015>

- [15] Alshamsan, A. (2014) Nanoprecipitation Is More Efficient than Emulsion Solvent Evaporation Method to Encapsulate Cucurbitacin I in PLGA Nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **22**, 219-222. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.12.002>
- [16] Zhang, Z., Qian, H., Yang, M., et al. (2017) Gambogic Acid-Loaded Biomimetic Nanoparticles in Colorectal Cancer Treatment. *International Journal of Nanomedicine*, **12**, 1593-1605. <https://doi.org/10.2147/IJN.S127256>
- [17] Wu, X., Li, Y., Raza, F., et al. (2021) Red Blood Cell Membrane-Camouflaged Tedizolid Phosphate-Loaded PLGA Nanoparticles for Bacterial-Infection Therapy. *Pharmaceutics*, **13**, Article 99. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010099>
- [18] Liu, X., You, J., Peng, X., et al. (2020) Mammalian Ste20-Like Kinase 4 Inhibits the Inflammatory Response in *Aspergillus fumigatus* Keratitis. *International Immunopharmacology*, **88**, Article 107021. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107021>
- [19] Brown, L., Leck, A.K., Gichangi, M., et al. (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)
- [20] Whitcher, J.P., Srinivasan, M. and Upadhyay, M.P. (2001) Corneal Blindness: A Global Perspective. *Bulletin of the World Health Organization*, **79**, 214-221.
- [21] Sharma, N., Bagga, B., Singhal, D., et al. (2022) Fungal Keratitis: A Review of Clinical Presentations, Treatment Strategies and Outcomes. *The Ocular Surface*, **24**, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2021.12.001>
- [22] Abbondante, S., Leal, S.M., Clark, H.L., et al. (2023) Immunity to Pathogenic Fungi in the Eye. *Seminars in Immunology*, **67**, Article 101753. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2023.101753>
- [23] Shukla, P.K., Kumar, M. and Keshava, G.B. (2008) Mycotic Keratitis: An Overview of Diagnosis and Therapy. *Mycoses*, **51**, 183-199. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2007.01480.x>
- [24] Kimakura, M., Usui, T., Yokoo, S., et al. (2014) Toxicity of Topical Antifungal Agents to Stratified Human Cultivated Corneal Epithelial Sheets. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, **30**, 810-814. <https://doi.org/10.1089/jop.2014.0044>
- [25] Niu, Y., Zhao, G., Li, C., 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>
- [26] Su, J., Liu, G., Lian, Y., et al. (2018) Preparation and Characterization of Erythrocyte Membrane Cloaked PLGA/ Arsenic Trioxide Nanoparticles and Evaluation of Their *in Vitro* Anti-Tumor Effect. *RSC Advances*, **8**, 20068-20076. <https://doi.org/10.1039/C8RA01417E>
- [27] Mills, B., Radhakrishnan, N., Karthikeyan Rajapandian, S.G., et al. (2021) The Role of Fungi in Fungal Keratitis. *Experimental Eye Research*, **202**, Article 108372. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108372>
- [28] Yang, R.-B., Wu, L.-P., Lu, X.-X., et al. (2021) Immunologic Mechanism of Fungal Keratitis. *International Journal of Ophthalmology*, **14**, 1100-1106. <https://doi.org/10.18240/ijo.2021.07.20>
- [29] Espinosa, V., Dutta, O., Mcelrath, C., et al. (2017) Type III Interferon Is a Critical Regulator of Innate Antifungal Immunity. *Science Immunology*, **2**, eaan5357. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan5357>
- [30] Fortingo, N., Melnyk, S., Sutton, S.H., et al. (2022) Innate Immune System Activation, Inflammation and Corneal Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, Article 14933. <https://doi.org/10.3390/ijms232314933>