

# 负载Ferrostatin-1的脱铁蛋白脂质体在真菌性角膜炎中的作用研究

胡露文<sup>1,2</sup>, 栾军杰<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>青岛大学青岛医学院, 山东 青岛

<sup>2</sup>青岛大学附属医院眼科, 山东 青岛

收稿日期: 2026年3月21日; 录用日期: 2026年4月16日; 发布日期: 2026年4月22日

## 摘要

Ferrostatin-1 (Fer-1)是一种常见的铁死亡抑制剂, 具有抗炎、抗氧化潜能, 但其存在水溶性差、体内半衰期短等问题限制了临床应用。本研究旨在构建一种负载Fer-1的脱铁蛋白修饰的纳米脂质体(Fer@Tf-LP), 评估其抗真菌、抗炎活性及生物安全性, 为真菌性角膜炎的治疗提供新策略。方法: 采用薄膜水化法制备包裹Fer-1的脂质体(Fer@LP), 通过后插入法偶联脱铁蛋白至脂质体表面(Fer@TF-LP), 并利用粒度电位分析仪、透射电子显微镜对Fer@LP和Fer@TF-LP的理化性质进行评估。采用CCK-8细胞增殖实验评价Fer@LP和Fer@TF-LP的药物毒性。通过最低抑菌浓度实验(MIC)等考察Fer@LP和Fer@TF-LP的抗真菌性能。烟曲霉菌感染人角膜上皮细胞(HCECs)后, 分别给予Fer-1、Fer@LP、Fer@TF-LP处理, 采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和酶联免疫吸附实验(ELISA)检测促炎细胞因子IL-6及IL-1 $\beta$  mRNA和蛋白的表达水平。结果: 成功制备了负载Fer-1的脱铁蛋白脂质体, 平均粒径为 $180.6 \pm 1.88$  nm, TEM结果显示Fer@LP和Fer@TF-LP均具备典型的球形纳米结构。CCK-8结果显示, 在实验浓度范围内, Fer@Tf-LP对HCECs活力无明显影响, 表明其具有良好的生物安全性。MIC实验结果显示, Fer@Tf-LP在45  $\mu$ g/mL浓度下对烟曲霉菌的抑制率即超过50%, 而游离Fer-1达到同等抑制效果所需浓度为90  $\mu$ g/mL, Fer@TF-LP对烟曲霉菌的抑菌活性优于Fer-1。此外, 与游离Fer-1相比, 同等浓度的Fer@Tf-LP处理能更显著地下调感染细胞中IL-6及IL-1 $\beta$ 的mRNA和蛋白表达水平。结论: 负载Fer-1的脱铁蛋白脂质体(Fer@Tf-LP)兼具高效抗真菌及抗炎特性, 且安全性良好。该纳米递药系统为改善真菌性角膜炎的治疗效果提供了新的思路。

## 关键词

真菌性角膜炎, 脂质体, Ferrostatin-1, 脱铁蛋白, 纳米递药系统

# Ferrostatin-1-Loaded Apotransferrin Liposomes for the Treatment of Fungal Keratitis

Luwen Hu<sup>1,2</sup>, Junjie Luan<sup>1,2\*</sup>

\*通讯作者。

文章引用: 胡露文, 栾军杰. 负载 Ferrostatin-1 的脱铁蛋白脂质体在真菌性角膜炎中的作用研究[J]. 临床医学进展, 2026, 16(4): 4417-4427. DOI: 10.12677/acm.2026.1641711

<sup>1</sup>Qingdao Medical College of Qingdao University, Qingdao Shandong

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: March 21, 2026; accepted: April 16, 2026; published: April 22, 2026

## Abstract

Ferrostatin-1 (Fer-1) is a well-established inhibitor of ferroptosis with documented anti-inflammatory and antioxidant properties. However, its clinical translation is hindered by poor aqueous solubility and a short *in vivo* half-life. The present study aimed to develop a Fer-1-loaded nanoliposome modified with apotransferrin (Fer@Tf-LP) and to evaluate its antifungal and anti-inflammatory efficacy, as well as its biosafety, thereby offering a potential therapeutic strategy for fungal keratitis. Fer-1-encapsulated liposomes (Fer@LP) were prepared using the thin-film hydration method. Apotransferrin was subsequently conjugated onto the liposomal surface via a post-insertion technique to generate Fer@Tf-LP. The physicochemical characteristics of both formulations were assessed using dynamic light scattering and transmission electron microscopy. Cytotoxicity was evaluated in human corneal epithelial cells (HCECs) using the CCK-8 assay. Antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* was determined through minimum inhibitory concentration (MIC) testing and assessment of conidial germination and hyphal growth. In an *A. fumigatus* infection model of HCECs, the expression levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-1 $\beta$  were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) following treatment with free Fer-1, Fer@LP, or Fer@Tf-LP. The results demonstrated that Fer@Tf-LP was successfully fabricated, displaying a spherical morphology with an average particle size of  $180.6 \pm 1.88$  nm. CCK-8 assays confirmed that Fer@Tf-LP exhibited no significant cytotoxicity against HCECs within the tested concentration range, indicating favorable biocompatibility. Notably, Fer@Tf-LP exhibited superior antifungal activity, achieving over 50% inhibition of *A. fumigatus* growth at  $45 \mu\text{g}/\text{mL}$ , whereas free Fer-1 required a concentration of  $90 \mu\text{g}/\text{mL}$  to achieve a comparable effect. Furthermore, Fer@Tf-LP significantly suppressed conidial germination and hyphal proliferation. In infected HCECs, treatment with Fer@Tf-LP at equivalent concentrations resulted in a more pronounced downregulation of IL-6 and IL-1 $\beta$  mRNA and protein levels compared to free Fer-1. In conclusion, the Fer-1-loaded apotransferrin liposome (Fer@Tf-LP) demonstrates potent antifungal and anti-inflammatory activities with a robust safety profile. This nanoscale drug delivery system presents a promising and innovative approach for improving the therapeutic outcomes of fungal keratitis.

## Keywords

*Aspergillus fumigatus*, Liposome, Ferrostatin-1, Apotransferrin, Nano-Drug Delivery System

Copyright © 2026 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)是致病性真菌侵入角膜组织引起的感染性疾病, 是全球视力丧失的主要病因之一[1]-[3]。农业外伤、隐形眼镜的不当使用、糖皮质激素类药物的滥用是其高发病率的重要原因[4]。FK 主要致病菌包括丝状真菌(如曲霉属和镰刀菌属)以及酵母菌(如念珠菌属)等[5]。目前, FK 的治疗主要以局部应用抗真菌药物滴眼液为主, 如那他霉素、伏立康唑、两性霉素 B 等, 但药物存在刺激

性大、渗透性差、停留时间短等弊端[6]。

Ferrostatin-1 (Fer-1)是一种小分子的抗氧化剂,其通过清除烷氧基和脂质过氧化过程中产生的亚铁离子[7],选择性地抑制铁死亡,进而在损伤组织中发挥抗炎作用。Fer-1在低浓度下( $<10 \mu\text{mol/L}$ )直接抑制包括荚膜组织胞浆菌在内的多种病原真菌的生长,保护巨噬细胞免受感染引起的死亡[8]。在白色念珠菌感染模型中,Fer-1处理不仅能提高巨噬细胞和肾小管上皮细胞的存活率,还能增强巨噬细胞的真菌杀伤能力,并显著降低体内真菌载量和肾脏免疫病理损伤[9]。然而,Fer-1水溶性差且在体内有效作用时间较短,其在临床治疗中的应用具有一定的局限性。因此,构建高效的Fer-1递送系统,对于充分发挥其在真菌性角膜炎等局部感染中的治疗价值具有重要意义。

角膜作为眼部药物递送的主要屏障,给疏水性药物的临床应用带来挑战[10][11]。脂质体纳米递送系统,因其良好的生物相容性和缓释特性,被广泛用于眼部药物递送[12]。脂质体含有类细胞膜的磷脂双分子层结构,可以将疏水性成分嵌入脂质双分子层中,增强其穿透性和溶解性[13],是负载疏水性药物Fer-1的理想载体。Wang等人[14]的研究将脂质体用于Fer-1眼部递送,发现在角膜碱烧伤模型中脂质体包裹能显著延长Fer-1在角膜前的滞留时间,增强细胞摄取,从而提高其抑制铁死亡和减轻角膜损伤的疗效。

脱铁蛋白是转铁蛋白(Transferrin, Tf)的无铁形式,此外还有单铁、铁饱和等不同形式存在[15]。Tf是一种分子量为76 kDa的糖蛋白,主要由肝脏合成。在哺乳动物体内,铁的螯合主要由Tf介导[16]。研究发现,Tf因其螯合铁的能力表现出强大的抗微生物活性,能够抑制革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌以及白色念珠菌(*Candida albicans*)的生长[17]-[20]。除了抗微生物活性外,脱铁蛋白还可以减轻过量铁诱导的氧化应激并调节过度的炎症反应,从而对器官和组织产生保护作用[21][22]。

基于此背景,我们制备并表征了这种新型纳米脂质体载药系统(Fer@Tf-LP),探讨其对烟曲霉菌的抗真菌和抗炎活性,并评估其安全性,为开发高效、低毒的FK治疗制剂提供新思路。

## 2. 材料与方法

### 2.1. Fer@LP与Fer@Tf-LP的制备和结构表征

采用薄膜水化法制备载有Fer-1的脂质体(Fer@LPs)。称取适量EPC(北京Solarbio公司)、胆固醇(上海圣丰生物科技有限公司)、DSPE-mPEG2000(北京Solarbio公司)和Fer-1(MedChemExpress),按质量比50:14:3:4溶解于氯仿/甲醇(2:1, v/v)的混合有机溶剂中,确保完全溶解,并将混合物转移至茄形烧瓶。使用旋转蒸发仪在减压下蒸发有机溶剂,直至烧瓶内壁形成均匀的脂质薄膜。取下烧瓶,15 mL超纯水涡旋混合进行水化。收集混合物转移至50 mL离心管,并在4°C下使用探头式超声仪超声处理5分钟,得到脂质体悬浮液。最后使用0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜(Merck Millipore)过滤以获得均质脂质体制剂。最终制备物于4°C储存备用。

采用后插入法制备脱铁蛋白修饰的Fer-1脂质体(Fer@Tf-LPs)。将10 mg/mL的脱铁蛋白溶液(上海翊圣生物科技有限公司)与4 mg/mL的Traut's试剂(北京Solarbio公司)按1:10的摩尔比(脱铁蛋白:Traut's试剂)混合,摇床孵育1小时进行巯基化反应。随后通过透析纯化巯基化的脱铁蛋白,并与DSPE-mPEG2000-MAL(上海阿拉丁生化科技公司)按1:10的摩尔比(脱铁蛋白:DSPE-mPEG2000-MAL)常温下反应过夜,形成DSPE-mPEG2000-Tf偶联物。将预先制备的Fer@LPs与DSPE-mPEG2000-Tf在37°C孵育30分钟,得到Fer@Tf-LPs,并使用截留分子量为100 kDa的超滤离心管(Merck Millipore)去除未结合的脱铁蛋白。最终制备物于4°C储存备用。

使用粒度电位分析仪(Malvern)在室温下测定Fer@LP和Fer@Tf-LP的平均Zeta电位和粒径。将Fer@LP和Fer@Tf-LP用磷钨酸染色后,使用透射电子显微镜(TEM, JEOL-1200EX)进行形貌观察。

## 2.2. CCK-8 实验

CCK-8 法检测 Fer-1、Fer@LP、Fer@Tf-LP 对 HCECs 细胞活性的影响。将 100  $\mu\text{L}$  HCECs ( $3 \times 10^4$ ) 接种于 96 孔板中, 37°C 培养箱中培养至细胞贴壁后吸出培养液, 分别用不同浓度的 Fer-1、Fer@LP、Fer@Tf-LP 的培养液在 37°C 下处理 24 h 后, 在每孔中加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 在 37°C 下继续培养 1 h, 然后使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度。

## 2.3. 菌株

本实验所用烟曲霉菌标准株 3.0772 购自中国普通微生物菌种保藏中心, 于 -80°C 冰箱中冻存备用。复苏时, 取保存菌液划线接种于固体培养基平板, 置于 37°C 恒温培养箱中静置培养 3~4 天, 待菌落生长成熟后, 向平板表面滴加适量无菌磷酸盐缓冲液(PBS), 用无菌涂布棒轻轻刮取菌落表面的孢子, 将所得孢子悬液经无菌滤膜过滤去除菌丝碎片, 收集滤液于无菌离心管中, 置于 4°C 冰箱短期保存。取适量孢子悬液接种于含沙氏液体培养基的锥形瓶中, 于 28°C 恒温条件下振荡培养 5~7 天, 直至培养基中出现肉眼可见的团块状菌丝体。用无菌镊子夹取菌丝团块, 转移至无菌培养皿中撕碎成小块, 再转入无菌研磨器中充分研磨成匀浆, 收集匀浆于离心管中, 于 4°C 预冷的离心机中以 5000 rpm 离心 15 分钟, 弃去上清液, 沉淀加入无菌 PBS 重悬洗涤后再次离心, 重复洗涤 3 次。向洗涤后的菌丝沉淀中加入适量 75% 乙醇, 涡旋震荡混匀后置于 4°C 冰箱中孵育过夜以充分灭活。次日将灭活后的菌丝悬液再次离心(4°C, 5000 rpm, 15 分钟), 弃去上清, 用无菌 PBS 重复洗涤 3 次以彻底去除残留乙醇, 最后向沉淀中加入适量高糖 DMEM 培养液, 充分震荡重悬后分装, 标记并于 -20°C 冰箱中长期保存, 即获得烟曲霉菌灭活菌丝体。

## 2.4. 最小抑菌浓度(MIC)实验

将不同浓度的脂质体制剂(Fer@LP 或 Fer@Tf-LP)加入含有密度为  $1 \times 10^5/\text{mL}$  烟曲霉菌分生孢子的沙氏培养基中, 充分混合后, 将每种溶液转移到 96 孔板上(100  $\mu\text{L}/$ 孔), 每个浓度重复 6 次。37°C 恒温箱中孵育 48 h 后, 用酶标仪在 540 nm 处测量吸光度值(OD)。在另一个 96 孔板中, 以相同方法将含有相同量 Fer-1 的组作为对照。

## 2.5. qRT-PCR

将 1 mL HCEC 细胞(人角膜上皮细胞, 厦门眼科中心)悬液接种于 12 孔板中, 并置于 37°C 细胞培养箱直至细胞贴壁且细胞密度达到 80%。向孔板中加入 60  $\mu\text{L}$  烟曲霉菌灭活菌丝刺激细胞 1 小时, 随后分别加入 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Fer-1、Fer@LP、Fer@Tf-LP 溶液。烟曲霉菌灭活菌丝刺激 8 小时后, 向细胞孔板中加入无菌 PBS 溶液清洗 3 次, 每孔加入 500  $\mu\text{L}$  Trizol 细胞裂解液。将 HCECs 细胞及裂解液收集于 ep 管中并提取总 RNA, 使用 NanoDrop ND-1000 系统测定所提 RNA 浓度, 并将其逆转录为 cDNA。将 cDNA 样本稀释后, 同 SYBR、引物、DEPC 水混合并加入八连排, 随后置于 PCR 仪中进行扩增, 最后根据循环数计算样本中不同因子 mRNA 的表达水平。引物序列见表 1:

**Table 1.** Nucleotide primer sequences for qRT-PCR

**表 1.** qRT-PCR 核苷酸引物序列

Gene	Forward primer (5'~3')	Reverse primer (5'~3')
$\beta$ -actin (Human)	GCTCCTCCTGAGCGCAAG	CATCTGCTGGAAGGTGGACA
IL-1 $\beta$ (Human)	ATGCACCTGTACGATCACTGA	ACAAAGGACATGGAGAACACC
IL-6 (Human)	AAGCCAGAGCTGTGCAGATGAGTA	TGTCCTGCAGCCACTGGTTC

## 2.6. ELISA

细胞培养方法同上, 吸取各孔细胞培养液至新 EP 管, 室温 1000 g 离心 20 min, 收集上清液。按照 ELISA 试剂盒(Elabscience)说明书检测 IL-1 $\beta$ 、IL-6 蛋白水平, 在 450 nm 和 570 nm 处用酶标仪测定吸光度。

## 2.7. 统计学分析

使用 SPSS 软件及 GraphPad Prism 软件对实验结果进行数据分析。计量资料数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间均数比较采用两独立样本的 t 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 当  $P < 0.05$  时认为组间差距具有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. Fer@LP 与 Fer@Tf-LP 的表征

负载 Fer-1 脂质体(Fer@LP)及负载 Fer-1 的脱铁蛋白脂质体(Fer@Tf-LP)的平均流体动力学直径分别为  $162.1 \pm 5.13$  nm 和  $180.6 \pm 1.88$  nm (图 1(a)和图 1(b))。Fer@LP 和 Fer@Tf-LP 的 Zeta 电位值分别为  $-16.93 \pm 0.41$  mV 和  $-33.87 \pm 0.40$  mV (图 1(c)和图 1(d))。同时, 两种脂质体制剂均呈现较窄的粒径分布, 多分散指数(PDI)值低于 0.4 (图 1(e)), 说明 Fer@LP 和 Fer@Tf-LP 具有良好的分散性。统计学分析显示, 与 Fer@LP 相比, Fer@Tf-LP 的流体动力学直径显著增大(图 1(f),  $**P < 0.01$ ); 同时, Fer@Tf-LP 的 Zeta 电位显著更负(图 1(g),  $***P < 0.001$ )。通过 TEM 对 Fer@LP 和 Fer@Tf-LP 的形貌和结构进行表征(图 1(h))。透射电镜图像显示所有制备的制剂分散良好, 呈现球形纳米结构, 可以观察到明显的核壳结构。综上所述, 证明成功制备了 Fer@LP 和 Fer@Tf-LP 两种载药脂质体。

### 3.2. Fer-1、Fer@LP、Fer@Tf-LP 的生物安全性

CCK-8 实验结果显示, 不同浓度的 Fer@LP 和 Fer@Tf-LP 均未显著抑制人角膜上皮细胞的活力。相反, 游离 Fer-1 在 45  $\mu\text{g/mL}$  时使细胞活力降至 90% 以下, 且细胞毒性呈明显的浓度依赖性。见图 2(a)~(c)。

### 3.3. Fer-1、Fer@LP、Fer@Tf-LP 的抗真菌活性

通过测定 540 nm 处的吸光度确定脂质体制剂的 MIC, 评估其抗真菌活性。结果显示, Fer@Tf-LP 对烟曲霉菌作用 36 h 后, 抑菌效果在 15  $\mu\text{g/mL}$  时开始显现, 在 45  $\mu\text{g/mL}$  浓度下真菌生长抑制率超过 50%, 而游离 Fer-1 达到同等抑制效果所需浓度为 90  $\mu\text{g/mL}$ , 说明 Fer@TF-LP 对烟曲霉菌的抑菌活性优于 Fer-1。因此, 后续实验选择 45  $\mu\text{g/mL}$  作为工作浓度。见图 3(a)~(c)。

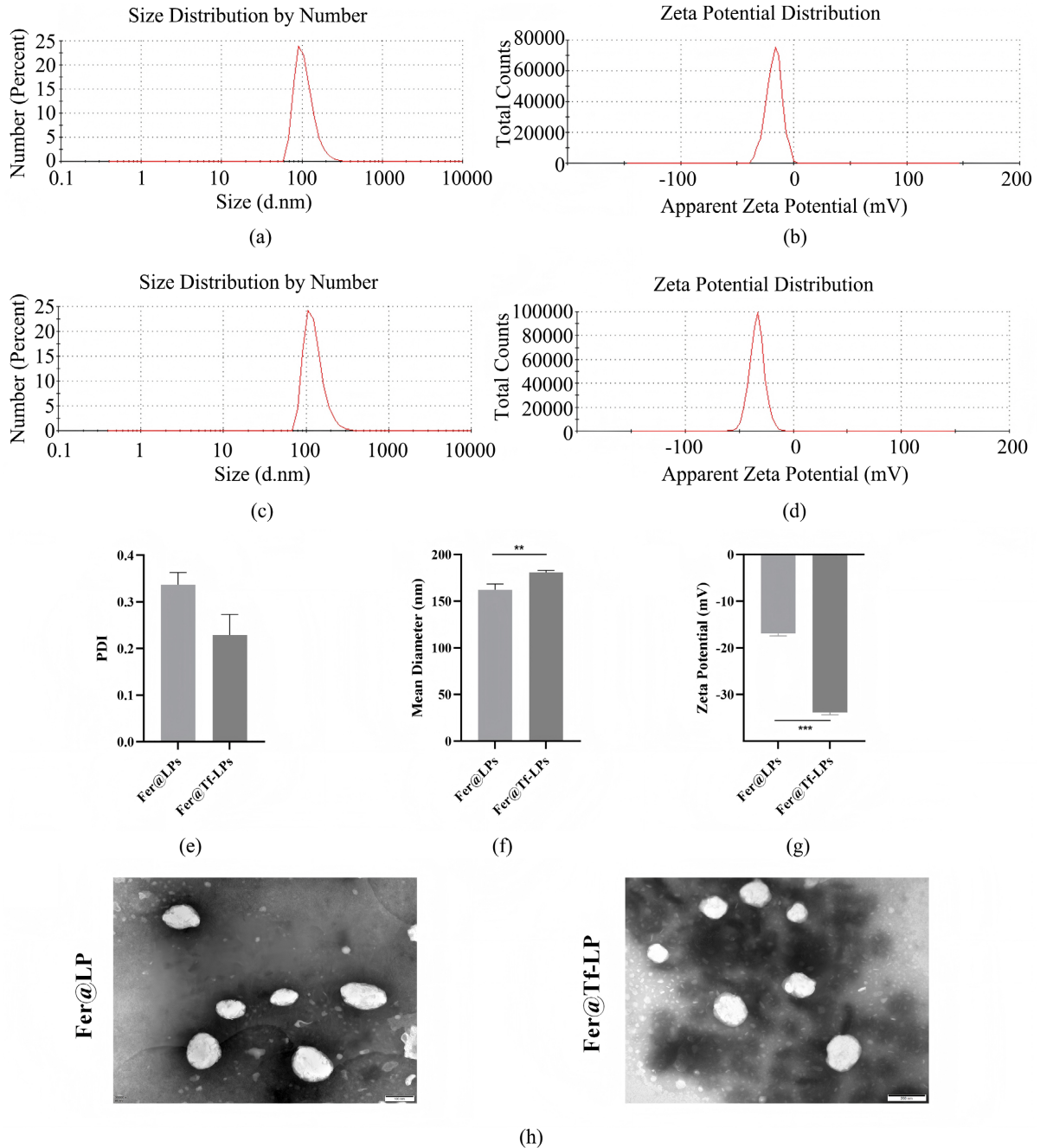
### 3.4. Fer-1、Fer@LP、Fer@Tf-LP 对烟曲霉菌刺激后的 HCECs 细胞中炎症因子的影响

我们利用烟曲霉菌灭活菌丝处理后的 HCEC 细胞建立模型, 分别用 Fer-1、Fer@LP、Fer@Tf-LP 刺激并提取 mRNA 样本。我们的研究结果显示, 在烟曲霉菌刺激后, HCEC 细胞中 IL-1 $\beta$  和 IL-6 在基因和蛋白水平的表达量明显升高。接下来, 我们分别使用同等浓度的 Fer-1、Fer@LP、Fer@Tf-LP 处理经烟曲霉菌刺激过后的细胞发现, Fer-1 处理后的 HCEC 细胞中 IL-1 $\beta$  和 IL-6 的 mRNA 和蛋白表达量明显降低, 且 Fer@Tf-LP 降低 IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 和蛋白表达量更多。见图 4(a)~(d)。

## 4. 讨论

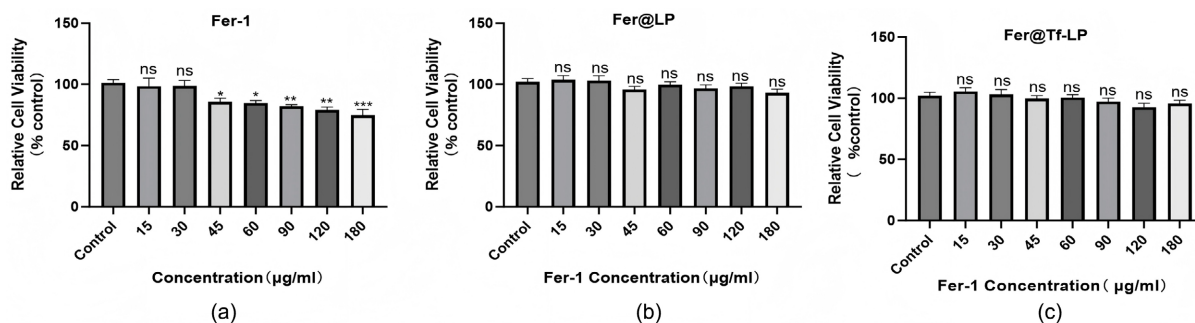
真菌性角膜炎(Fungal Keratitis, FK)作为一种高致盲性的角膜感染性疾病, 其发病率在全球范围内呈

持续上升趋势。广谱抗生素及糖皮质激素的广泛应用、隐形眼镜佩戴不当等因素是导致这一现象的重要原因[23]。然而, 现有抗真菌药物普遍存在角膜渗透性差、眼部生物利用度低等缺陷, 使得FK的临床治疗面临巨大挑战[24]。因此, 研发兼具高效、低毒的新型抗真菌制剂, 对于改善FK患者预后具有重要的临床意义。



注: Fer@LP (a)、Fer@Tf-LP (b)的流体动力学直径。Fer@LP (c)、Fer@Tf-LP (d)的 Zeta 电位。(e) Fer@LP、Fer@Tf-LP 两种脂质体制剂均呈现较窄的粒径分布。(f)与 Fer@LP 相比, Fer@Tf-LP 的流体动力学直径更大。(g)与 Fer@LP 相比, Fer@Tf-LP 的 Zeta 电位更负。(h)代表性透射电镜图像显示所有制备的制剂分散良好, 呈现球形纳米结构。(比较采用两独立样本的 t 检验, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001)

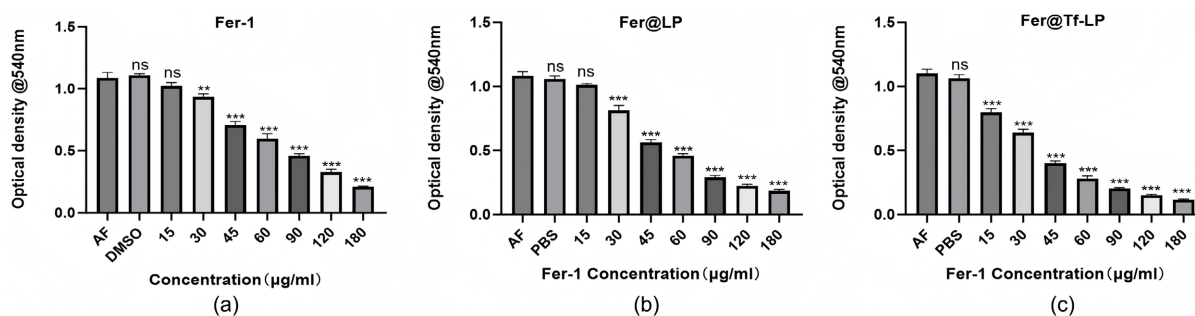
**Figure 1.** Successful preparation of the two drug-loaded liposomes, Fer@LP and Fer@Tf-LP  
**图 1.** 成功制备 Fer@LP 和 Fer@Tf-LP 两种载药脂质体



注: (a) 游离 Fer-1 在 45 µg/mL 时使细胞活力降至 90% 以下, 且细胞毒性呈明显的浓度依赖性。(b) 各实验浓度的 Fer@LP 均未显著抑制人角膜上皮细胞的活力。(c) 各实验浓度的 Fer@Tf-LP 均未显著抑制人角膜上皮细胞的活力。(比较采用两独立样本的 t 检验, 事后检验采用 Dunnett's post-hoc test, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, ns 差异无统计学意义)

Figure 2. Favorable biosafety of Fer@Tf-LP

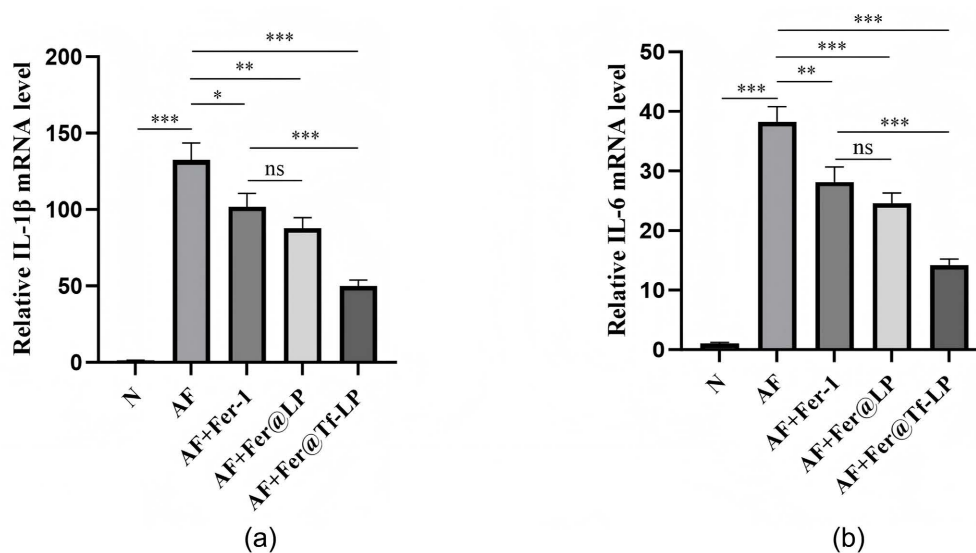
图 2. Fer@Tf-LP 具有良好的生物安全性

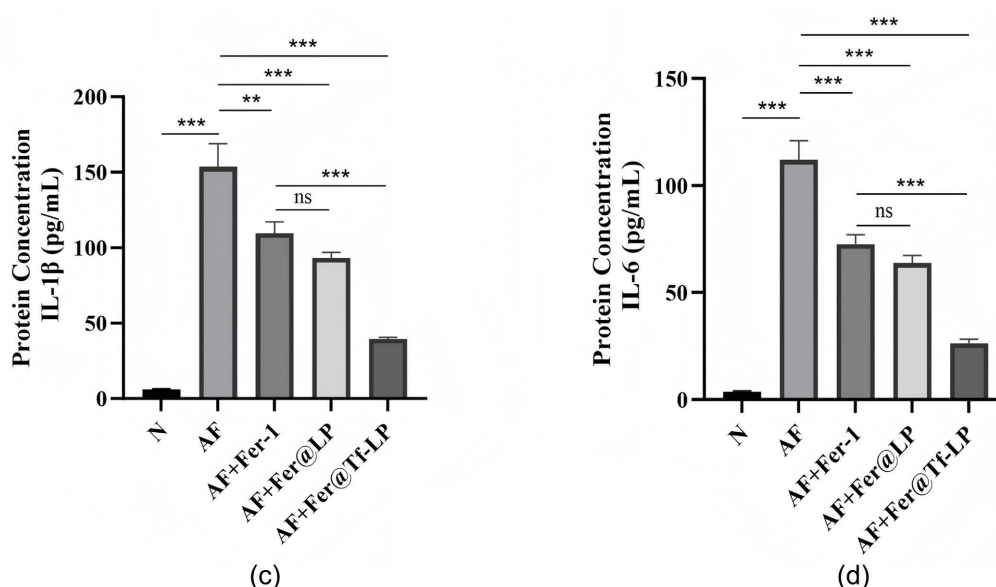


注: (a) 游离 Fer-1 对烟曲霉菌作用 36 h 后, 抑菌效果在 30 µg/mL 时开始显现, 在 90 µg/mL 浓度下真菌生长抑制率超过 50%。(b) Fer@LP 对烟曲霉菌作用 36 h 后, 抑菌效果在 30 µg/mL 时开始显现, 在 60 µg/mL 浓度下真菌生长抑制率超过 50%。(c) Fer@Tf-LP 对烟曲霉菌作用 36 h 后, 抑菌效果在 15 µg/mL 时开始显现, 在 45 µg/mL 浓度下真菌生长抑制率超过 50%。(比较采用单因素方差分析, 事后检验采用 Dunnett's post-hoc test; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, ns 差异无统计学意义)

Figure 3. Superior antifungal efficacy of Fer@Tf-LP

图 3. Fer@Tf-LP 具有更好的抗真菌能力





注: 与正常组相比, 烟曲霉菌刺激后 HCEC 细胞中 IL-1 $\beta$  的 mRNA (a)和蛋白(c)含量显著升高, 且在 Fer-1 处理后表达量下降, 相比 Fer-1, 同等浓度的 Fer@Tf-LP 表达量下降更显著。同样, IL-6 的 mRNA (b)和蛋白(d)表达量也在烟曲霉菌刺激后升高, 并在 Fer-1 处理后下调, 相比 Fer-1, 同等浓度的 Fer@Tf-LP 表达量下降更显著, 差异具有统计学意义。(比较采用单因素方差分析, 事后检验采用 Tukey's post-hoc test: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , ns 差异无统计学意义)

**Figure 4.** Inhibition of proinflammatory factor expression in *Aspergillus fumigatus*-stimulated HCECs by Fer@Tf-LP  
**图 4.** Fer@Tf-LP 降低烟曲霉菌灭活菌丝刺激后 HCEC 细胞中促炎因子的表达

Ferostatin-1 (Fer-1)是一种人工合成的亲脂性抗氧化剂,其分子式为  $C_{15}H_{22}N_2O_2$ , 分子量为 262.35 [25]。Fer-1 作为经典的铁死亡抑制剂之一,其抑制铁死亡的活性是由于清除了细胞内  $Fe^{2+}$  在脂质过氧化反应中产生的烷氧自由基和其他重排产物[7]。近年来, Fer-1 在感染性疾病中的潜在应用价值受到关注。先前有研究发现感染致病性酵母组织胞浆菌的巨噬细胞中存在铁死亡现象, Fer-1 不仅能减少体外感染巨噬细胞的死亡, 而且还能抑制各种荚膜真菌生长[8]。而我们的研究证明 Fer-1 对烟曲霉菌有良好的抑菌活性。已有结构分析表明 Fer-1 与唑类真菌固醇合成抑制剂(含 N 的五元杂环化合物)结构上有潜在的相似性, 这种共轭氨基可能会与 CYP 51 的血红素铁配合以阻断活性位点。经 Fer-1 培养后, 真菌的麦角固醇含量下降了两倍多[8]。我们认为这可能是 Fer-1 抗烟曲霉菌的一种潜在机制。然而 Fer-1 的亲脂性和不稳定性导致其在体内实验中的药物利用度往往较低, 限制了其广泛的临床应用[26]。Fer-1 分子上的自由酯基使得它易于发生水解反应转化为非活性的羧酸基, 缩短了其在体内的停留和作用时间[27]。因此, 探索更为安全、有效的递药系统改善 Fer-1 的药物利用度, 成为推动其临床转化的关键。

由于泪液冲刷、眨眼反射、眼表屏障等影响, 传统的滴眼液给药后生物利用度很低。近年来, 随着纳米药物研发的快速发展, 脂质体药物递送系统在眼科受到了广泛关注[12] [28]。脂质体是由磷脂和胆固醇组成, 具有类脂质双分子层的微型囊泡, 其粒径自 25 至 1000 nm 不等[29]。脂质体可以将脂溶性药物负载于囊泡疏水基团的夹层中, 提高药物的溶解性及角膜穿透性, 并能在作用部位维持药物活性并控制释放[30] [31], 是一种理想的亲脂药物负载系统。基于以上背景, 我们采用薄膜水化法制备 Fer@LP, 用后插入法将脱铁蛋白修饰在 Fer@LP 表面制备 Fer@Tf-LP, 并多次通过 0.22  $\mu m$  滤膜以获得均一粒径。TEM 显示所制备的纳米脂质体制剂均分散良好。Fer@LP 和 Fer@Tf-LP 的平均流体动力学直径分别为  $162.1 \pm 5.13$  nm 和  $180.6 \pm 1.88$  nm, 脱铁蛋白的引入导致纳米脂质体尺寸适度增加, 证明脱铁蛋白在纳米脂质体表面的成功偶联。通过电位检测发现 Fer@Tf-LP 的 Zeta 电位值为  $-16.93 \pm 0.41$  mV, 与 Fer@LP 的

-33.87 ± 0.40 mV 相比更负, 提示纳米脂质体表面带负电的脱铁蛋白的存在, 进一步验证了表面修饰效果, 这与先前关于蛋白修饰纳米载体的研究一致[32]。体外抗真菌实验表明, Fer@Tf-LP 在 45 μg/mL 浓度下即可实现对烟曲霉菌生长的显著抑制(抑制率 > 50%), 其抗真菌效能较游离 Fer-1 提高近一倍。先前有研究表明, 由于脱铁蛋白本身作为铁螯合剂, 可通过剥夺环境中真菌生长所必需的铁离子从而有效抑制烟曲霉生长[33]。这种铁结合蛋白在体外与利福平协同对抗金黄色葡萄球菌, 将利福平的最低抑菌浓度(MIC)从 0.15 mg/L 大幅降至 0.019 mg/L, 降幅高达 8 倍。此外, 脱铁蛋白还能够抑制革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌以及白色念珠菌的生长[17]-[20]。本研究证实了所制备的脱铁蛋白纳米脂质体对 Fer-1 的增效作用, 使其在更低浓度下即可发挥高效的抗真菌活性。

除抗真菌活性外, 本研究还观察到 Fer-1 可下调烟曲霉菌感染的人角膜上皮细胞中 IL-6 及 IL-1β 的 mRNA 和蛋白的表达水平, 表现出良好的抗炎效应。这一结果与近年来 Millet 等人[9]关于 Fer-1 在真菌感染中调控宿主炎症反应的研究相符, Fer-1 不仅减少白色念珠菌感染期间巨噬细胞和肾小管上皮细胞的死亡, 还能显著降低 TNF-α、IL-1β、IL-6 等促炎细胞因子的分泌, 从而减轻小鼠肾组织真菌负荷并改善生存率。值得注意的是, 本研究中脱铁蛋白的修饰进一步增强了 Fer-1 的抗炎活性, 提示脱铁蛋白本身可能也参与了炎症调控过程。先前有文献表明铁过载在多种血液和神经系统疾病模型中发挥促炎作用。镰状细胞病(SCD)患者体内的铁会促进中性粒细胞释放中性粒细胞胞外陷阱(NETs), 直接激活体内的炎症反应, 而铁清除剂, 如去铁胺和脱铁蛋白, 均可以抑制 NETs 的形成[34]。此外, 通过脱铁蛋白治疗降低了循环中的活性铁水平, 通过抑制氧化应激来防止肾缺血再灌注(I/R)损伤[35]。因此, Fer@Tf-LP 表现出更好的抗炎特性。

## 5. 结论

综上所述, 本研究成功构建了负载 Fer-1 的脱铁蛋白脂质体(Fer@Tf-LP)。该递药系统不仅显著提升了 Fer-1 的抗烟曲霉菌效能, 并在体外可以降低烟曲霉菌诱导的 HCEC 细胞中 IL-6 和 IL-1β 炎症因子水平, 兼具高效抗真菌及抗炎特性, 且安全性良好, 为改善真菌性角膜炎的治疗效果提供研究基础和方案。

## 参考文献

- [1] Bisen, A.C., Sanap, S.N., Agrawal, S., Biswas, A., Mishra, A., Verma, S.K., *et al.* (2024) Etiopathology, Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Fungal Keratitis. *ACS Infectious Diseases*, **10**, 2356-2380. <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.4c00203>
- [2] Whitcher, J.P., Srinivasan, M. and Upadhyay, M.P. (2001) Corneal Blindness: A Global Perspective. *Bulletin of the World Health Organization*, **79**, 214-221.
- [3] 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)
- [4] Lalitha, P., Prajna, N.V., Kabra, A., Mahadevan, K. and Srinivasan, M. (2006) Risk Factors for Treatment Outcome in Fungal Keratitis. *Ophthalmology*, **113**, 526-530. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2005.10.063>
- [5] Niu, L., Liu, X., Ma, Z., Yin, Y., Sun, L., Yang, L., *et al.* (2020) Fungal Keratitis: Pathogenesis, Diagnosis and Prevention. *Microbial Pathogenesis*, **138**, Article ID: 103802. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103802>
- [6] Ghenciu, L.A., Faur, A.C., Bolintineanu, S.L., Salavat, M.C. and Maghiari, A.L. (2024) Recent Advances in Diagnosis and Treatment Approaches in Fungal Keratitis: A Narrative Review. *Microorganisms*, **12**, Article No. 161. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010161>
- [7] Miotto, G., Rossetto, M., Di Paolo, M.L., Orian, L., Venerando, R., Roveri, A., *et al.* (2020) Insight into the Mechanism of Ferroptosis Inhibition by Ferrostatin-1. *Redox Biology*, **28**, Article ID: 101328. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101328>
- [8] Horwath, M.C., Bell-Horwath, T.R., Lescano, V., Krishnan, K., Merino, E.J. and Deepe, G.S. (2017) Antifungal Activity of the Lipophilic Antioxidant Ferrostatin-1. *ChemBioChem*, **18**, 2069-2078. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700105>
- [9] Millet, N., Solis, N.V., Aguilar, D., Lionakis, M.S., Wheeler, R.T., Jendzjowsky, N., *et al.* (2022) IL-23 Signaling

- Prevents Ferroptosis-Driven Renal Immunopathology during Candidiasis. *Nature Communications*, **13**, Article No. 5545. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33327-4>
- [10] Mandal, A., Pal, D., Agrahari, V., Trinh, H.M., Joseph, M. and Mitra, A.K. (2018) Ocular Delivery of Proteins and Peptides: Challenges and Novel Formulation Approaches. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **126**, 67-95. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.01.008>
- [11] Dave, R.S., Goostrey, T.C., Ziolkowska, M., Czerny-Holownia, S., Hoare, T. and Sheardown, H. (2021) Ocular Drug Delivery to the Anterior Segment Using Nanocarriers: A Mucoadhesive/Mucopenetrative Perspective. *Journal of Controlled Release*, **336**, 71-88. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.06.011>
- [12] López-Cano, J.J., González-Cela-Casamayor, M.A., Andrés-Guerrero, V., Herrero-Vanrell, R. and Molina-Martínez, I.T. (2021) Liposomes as Vehicles for Topical Ophthalmic Drug Delivery and Ocular Surface Protection. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **18**, 819-847. <https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1872542>
- [13] Dymek, M. and Sikora, E. (2022) Liposomes as Biocompatible and Smart Delivery Systems—The Current State. *Advances in Colloid and Interface Science*, **309**, Article ID: 102757. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102757>
- [14] Wang, K., Jiang, L., Zhong, Y., Zhang, Y., Yin, Q., Li, S., et al. (2022) Ferrostatin-1-Loaded Liposome for Treatment of Corneal Alkali Burn via Targeting Ferroptosis. *Bioengineering & Translational Medicine*, **7**, e10276. <https://doi.org/10.1002/btm2.10276>
- [15] Kemp, S.F., Creech, R.H. and Horn, T.R. (1984) Glycosylated Albumin and Transferrin: Short-Term Markers of Blood Glucose Control. *The Journal of Pediatrics*, **105**, 394-398. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(84\)80011-6](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(84)80011-6)
- [16] Hood, M.I. and Skaar, E.P. (2012) Nutritional Immunity: Transition Metals at the Pathogen-Host Interface. *Nature Reviews Microbiology*, **10**, 525-537. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2836>
- [17] Luna, B.M., Ershova, K., Yan, J., Ulhaq, A., Nielsen, T.B., Hsieh, S., et al. (2019) Adjunctive Transferrin to Reduce the Emergence of Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **74**, 2631-2639. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz225>
- [18] Han, Y. (2014) Apotransferrin Has a Second Mechanism for Anticandidal Activity through Binding of Candida Albicans. *Archives of Pharmacal Research*, **37**, 270-275. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0263-7>
- [19] Han, Y. (2014) The Identification of Surface Interaction of Apotransferrin with Candida Albicans. *Archives of Pharmacal Research*, **37**, 1301-1307. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0301-5>
- [20] Lin, L., Pantapalangkoor, P., Tan, B., Bruhn, K.W., Ho, T., Nielsen, T., et al. (2014) Transferrin Iron Starvation Therapy for Lethal Bacterial and Fungal Infections. *Journal of Infectious Diseases*, **210**, 254-264. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu049>
- [21] Guardia Clausi, M., Paez, P.M., Pasquini, L.A. and Pasquini, J.M. (2016) Inhalation of Growth Factors and Apo-Transferrin to Protect and Repair the Hypoxic-Ischemic Brain. *Pharmacological Research*, **109**, 81-85. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.010>
- [22] Vinchi, F., Porto, G., Simmelbauer, A., Altamura, S., Passos, S.T., Garbowski, M., et al. (2020) Atherosclerosis Is Aggravated by Iron Overload and Ameliorated by Dietary and Pharmacological Iron Restriction. *European Heart Journal*, **41**, 2681-2695. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz112>
- [23] Khor, W., Prajna, V.N., Garg, P., Mehta, J.S., Xie, L., Liu, Z., et al. (2018) The Asia Cornea Society Infectious Keratitis Study: A Prospective Multicenter Study of Infectious Keratitis in Asia. *American Journal of Ophthalmology*, **195**, 161-170. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2018.07.040>
- [24] Toumasis, P., Tsantes, A.G., Tsiogka, A., Samonis, G. and Vrioni, G. (2024) From Clinical Suspicion to Diagnosis: A Review of Diagnostic Approaches and Challenges in Fungal Keratitis. *Journal of Clinical Medicine*, **13**, Article No. 286. <https://doi.org/10.3390/jcm13010286>
- [25] Stockwell, B.R. (2022) Ferroptosis Turns 10: Emerging Mechanisms, Physiological Functions, and Therapeutic Applications. *Cell*, **185**, 2401-2421. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.003>
- [26] Jiang, X., Stockwell, B.R. and Conrad, M. (2021) Ferroptosis: Mechanisms, Biology and Role in Disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **22**, 266-282. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00324-8>
- [27] Devisscher, L., Van Coillie, S., Hofmans, S., Van Rompaey, D., Goossens, K., Meul, E., et al. (2018) Discovery of Novel, Drug-Like Ferroptosis Inhibitors with *in Vivo* Efficacy. *Journal of Medicinal Chemistry*, **61**, 10126-10140. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01299>
- [28] Lajunen, T., Hisazumi, K., Kanazawa, T., Okada, H., Seta, Y., Yliperttula, M., et al. (2014) Topical Drug Delivery to Retinal Pigment Epithelium with Microfluidizer Produced Small Liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **62**, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.04.018>
- [29] Li, M., Du, C., Guo, N., Teng, Y., Meng, X., Sun, H., et al. (2019) Composition Design and Medical Application of Liposomes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **164**, 640-653. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.007>

- 
- [30] Hironaka, K., Inokuchi, Y., Tozuka, Y., Shimazawa, M., Hara, H. and Takeuchi, H. (2009) Design and Evaluation of a Liposomal Delivery System Targeting the Posterior Segment of the Eye. *Journal of Controlled Release*, **136**, 247-253. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.02.020>
- [31] Ebrahim, S., Peyman, G.A. and Lee, P.J. (2005) Applications of Liposomes in Ophthalmology. *Survey of Ophthalmology*, **50**, 167-182. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2004.12.006>
- [32] Cheung, T.H., Xue, C., Kurtz, D.A. and Shoichet, M.S. (2023) Protein Release by Controlled Desorption from Transiently Cationic Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **15**, 50560-50573. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c19877>
- [33] Petzer, V., Wermke, M., Tymoszuk, P., Wolf, D., Seifert, M., Ovaçin, R., *et al.* (2019) Enhanced Labile Plasma Iron in Hematopoietic Stem Cell Transplanted Patients Promotes Aspergillus Outgrowth. *Blood Advances*, **3**, 1695-1700. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000043>
- [34] Van Avondt, K., Schimmel, M., Bulder, I., van Mierlo, G., Nur, E., van Bruggen, R., *et al.* (2023) Circulating Iron in Patients with Sickle Cell Disease Mediates the Release of Neutrophil Extracellular Traps. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **50**, 321-329. <https://doi.org/10.1159/000526760>
- [35] de Vries, B., Walter, S.J., von Bonsdorff, L., Wolfs, T.G.A.M., van Heurn, L.W.E., Parkkinen, J., *et al.* (2004) Reduction of Circulating Redox-Active Iron by Apotransferrin Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Transplantation*, **77**, 669-675. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000115002.28575.e7>