

# 血小板细胞膜仿生纳米系统在烟曲霉菌性角膜炎中的抗炎作用

张芸凤, 刘 星, 田怡然, 林 静\*

青岛大学附属医院眼科, 山东 青岛

收稿日期: 2024年3月25日; 录用日期: 2024年4月19日; 发布日期: 2024年4月26日

## 摘 要

目的: 构建一种血小板细胞膜包覆聚乳酸-羟基乙酸聚合物(poly (lactic-co-glycolic acid), PLGA)的仿生纳米系统(PLTm@PLGA), 评估其在烟曲霉菌性角膜炎中的抗炎作用。方法: 制备并表征PLTm@PLGA。通过CCK-8、溶血试验检测生物安全性。实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测烟曲霉菌刺激RAW264.7细胞后炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 的mRNA表达水平。建立烟曲霉菌性角膜炎小鼠模型, 观察治疗效果并进行炎症评分。结果: PLTm@PLGA呈球形, 表现为典型的“壳-核”结构, 其粒径为 $234.3 \pm 8.9$  nm。PLGA、PLTm@PLGA无明显细胞毒性, 血液相容性好。PLTm@PLGA显著抑制RAW264.7细胞中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA表达。PLTm@PLGA处理组临床炎症评分显著下降。结论: PLTm@PLGA具有良好生物相容性, 抑制促炎细胞因子表达, 减轻了小鼠烟曲霉菌性角膜炎的炎症反应。

## 关键词

血小板细胞膜, 聚乳酸-羟基乙酸聚合物, 抗炎, 烟曲霉菌性角膜炎

# Anti-Inflammatory Effect of Platelet Membrane Biomimetic Nanosystem in *Aspergillus fumigatus* Keratitis

Yunfeng Zhang, Xing Liu, Yiran Tian, Jing Lin\*

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

Received: Mar. 25<sup>th</sup>, 2024; accepted: Apr. 19<sup>th</sup>, 2024; published: Apr. 26<sup>th</sup>, 2024

## Abstract

**Objective:** Poly (lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) was coated with platelet membranes to con-  
\*通讯作者。

文章引用: 张芸凤, 刘星, 田怡然, 林静. 血小板细胞膜仿生纳米系统在烟曲霉菌性角膜炎中的抗炎作用[J]. 临床医学进展, 2024, 14(4): 2045-2054. DOI: 10.12677/acm.2024.1441261

struct a biomimetic NanoSystem (PLTm@PLGA), which was evaluated its protective effect in *Aspergillus fumigatus* keratitis. Methods: PLTm@PLGA was prepared and characterized. The biosafety was investigated by CCK-8 and hemolysis tests. The mRNA expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in RAW264.7 cells stimulating with *Aspergillus fumigatus*. Mice models of *Aspergillus fumigatus* keratitis were established to observe the therapeutic effect and score the inflammation. Results: PLTm@PLGA is spherical and has a typical "shell-core" structure, and its particle size was  $234.3 \pm 8.9$  nm. PLGA and PLTm@PLGA showed no significant cytotoxicity and hemolysis. PLTm@PLGA significantly inhibited the mRNA expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in RAW264.7 cells. The clinical inflammation score was significantly decreased in PLTm@PLGA group. Conclusion: PLTm@PLGA has great biosafety, and plays an anti-inflammatory role in *Aspergillus fumigatus* keratitis in mice by inhibiting the expression of inflammatory cytokines.

## Keywords

Platelet Membrane, Poly (Lactic Acid-Co-Glycolic Acid), Anti-Inflammatory, *Aspergillus fumigatus* Keratitis

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(Fungal keratitis, FK)是由真菌感染和过度炎症引发的角膜疾病,若不及时治疗会造成失明等不可挽回的后果[1] [2]。近期,一项回顾性研究显示,除角膜移植术后感染病例,在临床怀疑 FK 患者中,镰刀菌属和曲霉菌属是最常见的致病菌属[3]。真菌感染角膜后,固有免疫被激活,模式识别受体识别真菌细胞壁表面的病原体相关分子模式,从而诱导趋化因子和炎症因子产生,促进免疫细胞向角膜病变区募集,以抵御病原体侵袭[4]。然而,由于过度炎症反应积累大量免疫细胞、炎症因子,造成角膜组织损伤和混浊加重,导致 FK 预后不良。因此,减轻过度炎症反应也是治疗 FK 的重要手段。

近年来,细胞膜仿生纳米系统因其良好的生物相容性、可生物降解及其独特功能获得了极大关注。其中,血小板是一种具有炎症靶向作用的无核细胞,在外周血中含量丰富[5] [6]。Jin 等研究的小血小板细胞膜所包被的纳米颗粒可以减少促炎因子的产生并减轻肺部炎症,显示出血小板细胞膜趋炎性的优势[5]。血小板的经典功能包括黏附在破损血管壁,进行止血。已有研究表明,在感染性疾病中血小板可粘附真菌、细菌等病原体[7] [8] [9],并且能够中和毒素,减少金黄色葡萄球菌对吞噬细胞的攻击,从而改善全身感染的预后[10]。PLGA 具有独特的理化特性,如形态规整、粒径可调节、物理刚性、生物相容性以及生物可降解性[11] [12] [13]。凭借这些优势,PLGA 已被广泛应用于纳米载体的制备。本研究通过设计制备血小板细胞膜仿生纳米系统,探究其在体内外烟曲霉菌性角膜炎中的作用。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验对象及试剂

#### 2.1.1. 实验对象

健康雌性 C57BL/6 小鼠(6~8 周龄)购买自中国济南朋悦实验动物有限公司。所有小鼠均已排除眼前节

异常情况。依据美国眼科和视觉研究协会(ARVO)标准处理所有实验小鼠。巨噬细胞 RAW264.7 购买自中国科学院。标准烟曲霉菌株(CGMCC 3.14869)由中国普通微生物菌种保藏管理中心提供。

### 2.1.2. 实验试剂

PLGA (50:50)购买自济南岱罡生物工程有限公司。牛血清白蛋白(BSA)、磷酸盐缓冲液粉末(PBS)、沙氏培养基、Tween 20、PMSF 均购买自 Solarbio 公司。二氯甲烷(美国 Sigma 公司), Cell counting kit-8 (CCK-8)试剂盒(美国 MCE 公司)。BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Elabscience 公司)。

## 2.2. 实验方法

### 2.2.1. 血小板细胞膜分离纯化

获取健康 C57BL/6 小鼠外周血, 差速离心法[14]将上层富集血小板血浆与下层红细胞分离。分装红细胞用于后续溶血试验。分装上层富集血小板血浆并加入 1 mM EDTA 和 2  $\mu$ M PMSF。800 g 离心 20 分钟纯化血小板, 置于液氮迅速冷冻, 并于室温解冻。通过反复冻融法使血小板破裂。8000 g 离心 15 分钟, 收集血小板细胞膜后 PBS 重悬。超声细胞破碎仪(Q500 Sonicator, 美国)连续超声 1 分钟破碎血小板细胞膜。BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定血小板细胞膜浓度。

### 2.2.2. PLTm@PLGA 的制备

采用乳液溶剂挥发法[15]制备 PLGA 纳米颗粒。称取 4 mg BSA 溶解于 100 mL 去离子水(ddH<sub>2</sub>O)中, 得到 4% BSA 溶液。精确称量 20 mg PLGA 溶于 5 mL 二氯甲烷中作为有机相。将有机相逐滴缓慢加入 4% BSA 溶液中, 得到乳白色溶液。冰水浴下超声处理 3 分钟。最后, 将其置于磁力搅拌器(时博, 中国), 搅拌过夜以挥发有机溶剂。4 $^{\circ}$ C 12,000 rpm 离心 15 分钟收集沉淀。充分洗涤去除残留的有机溶剂, 冷冻干燥并收集 PLGA 纳米颗粒。

使用共挤出法制备血小板细胞膜包覆 PLGA 的仿生纳米颗粒。将血小板细胞膜与 PLGA 纳米颗粒按照 1:10 质量比充分混匀, 通过反复挤压脂质体挤出器(LiposoFast-Basic Avanti, 美国)得到 PLTm@PLGA, 冷冻干燥并收集最终产物。

### 2.2.3. PLTm@PLGA 的表征

使用粒度电位分析仪(NanoSight 公司, 英国)检测 PLTm@PLGA 的粒径分布及表面 Zeta 电位。通过透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察其形态。TEM 样本滴到铜网格上的多孔碳膜上, 自然干燥后观察并拍照。

### 2.2.4. PLTm@PLGA 的生物安全性

CCK-8 实验检测体外 PLGA、PLTm@PLGA 对 RAW264.7 细胞活力的影响。RAW264.7 细胞接种于 96 孔细胞板中, 培养细胞密度达到 80%~90%时开始处理细胞。更换含有不同浓度(0, 3.906, 7.813, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500  $\mu$ g/mL)的 PLGA、PLTm@PLGA 培养液后, 继续培养 24 小时。无菌 PBS 洗涤 3 次, 避光条件下将每孔加入 10  $\mu$ L 含有 CCK-8 的培养液, 继续培养 2 小时。最后使用酶标仪(PerkinElmer 公司, 美国)测定 450 nm 处的吸光度。实验重复 3 次。

为了进一步评估生物安全性, 我们进行了溶血试验。使用预冷 PBS 洗涤红细胞, 4 $^{\circ}$ C, 3000 rpm, 20 分钟。然后将 4%的红细胞悬液分别与 ddH<sub>2</sub>O、PBS、PLGA、PLTm@PLGA 混合。ddH<sub>2</sub>O 混合的红细胞作为阳性对照组, PBS 混合的红细胞作为阴性对照组。所有处理组 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 2 小时, 观察溶血情况。4 $^{\circ}$ C, 3500 rpm 离心 5 分钟, 拍照离心管内的溶血状态, 并收集上清加至 96 孔板, 使用酶标仪在 541 nm 处测量其吸光度。同时, 在显微镜下观察各组血细胞形态。

### 2.2.5. 烟曲霉菌培养与制备

基于本实验室原有方法[16]制备烟曲霉分生孢子及菌丝, 用含 0.1% Tween 20 的无菌 PBS 冲洗培养烟曲霉菌的沙氏培养基, 获得分生孢子。离心后重悬分生孢子。烟曲霉菌接种在装有沙氏液体培养基的锥形瓶内, 并用无菌组培封口膜封闭。锥形瓶放置在培养箱中培养 4~5 天, 直到生成大量菌丝, 收集菌丝并研磨成碎片。然后用无菌 PBS 洗涤, 4000 g 离心 40 分钟得到菌丝液。75%乙醇灭活真菌菌丝, PBS 反复洗涤离心后用 DMEM 调整灭活菌丝浓度。

### 2.2.6. 细胞培养及处理

将 RAW264.7 细胞接种在 12 孔板中, 随后放置在含有 5% CO<sub>2</sub> 的 37℃ 细胞培养箱中, 培养至细胞密度达 80%~90%, 加入灭活烟曲霉菌丝刺激 RAW264.7 细胞, 共培养 1 小时后, 分别给予 PLGA、PLTm@PLGA 处理 7 小时。吸除上清液并用无菌 PBS 洗涤细胞, 收集 RAW264.7 细胞用于 RT-qPCR 实验。从 Genebank 中检索小鼠  $\beta$ -actin、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的 mRNA 序列, 设计并合成 PCR 引物。实验所需基因序列如表 1:

**Table 1.** Primer sequence of RT-qPCR

**表 1.** RT-qPCR 引物序列

基因	引物序列	基因库
$\beta$ -actin (Mouse)	F: GATACTGCTCTGGCTCCTAGC R: GACTCATCGTACTCCTGCTTGC	NM_007393.5
IL-1 $\beta$ (Mouse)	F: CGCAGCAGCACATCACAAGAGC R: TGTCCATCATCCTGGAAGGTCCACG	NM_008361.4
TNF- $\alpha$ (Mouse)	F: ACCCTCACACTCAGATCATCTT R: GGTTGTCTTTGAGATCCATGC	NM_013693.3

### 2.2.7. 烟曲霉菌性角膜炎小鼠模型建立

健康 C57BL/6 小鼠随机分组, 每只小鼠的右眼作为空白对照, 左眼为实验组。建模: 使用一次性无菌胰岛素针在小鼠角膜建立基质隧道口, Hamilton 微量注射器抽吸 2  $\mu$ L 烟曲霉菌孢子, 针头进入隧道并缓慢匀速推注孢子。实验组小鼠左眼随机分为 AF 组、PLGA 治疗组和 PLTm@PLGA 治疗组。各组小鼠每日 4 次点眼治疗, 每次 3  $\mu$ L。分别于术后 1、3、5 天使用裂隙灯显微镜(CarlZeiss 公司, 德国)观察并拍照。依据临床评分[17]评估烟曲霉菌性角膜炎的严重程度。评分标准如表 2:

**Table 2.** Clinical classification and scoring criteria for FK in mice

**表 2.** 小鼠真菌性角膜炎临床分级及评分标准

	I 级(1 分)	II 级(2 分)	III 级(3 分)	IV 级(4 分)
溃疡面积	1%~25%	26%~50%	51%~75%	76%~100%
混浊程度	虹膜纹理尚清瞳孔可见 角膜轻度混浊	虹膜可见 角膜较混浊	虹膜不见 角膜不均匀混浊	角膜均匀重度混浊
溃疡形态	轻度不规则	轻度水肿不规则	重度水肿翳样混浊或后弹力层膨出	穿孔或后弹力层膨出

注: 小鼠角膜临床评分为三项指标分数之和。

## 2.3. 统计学方法

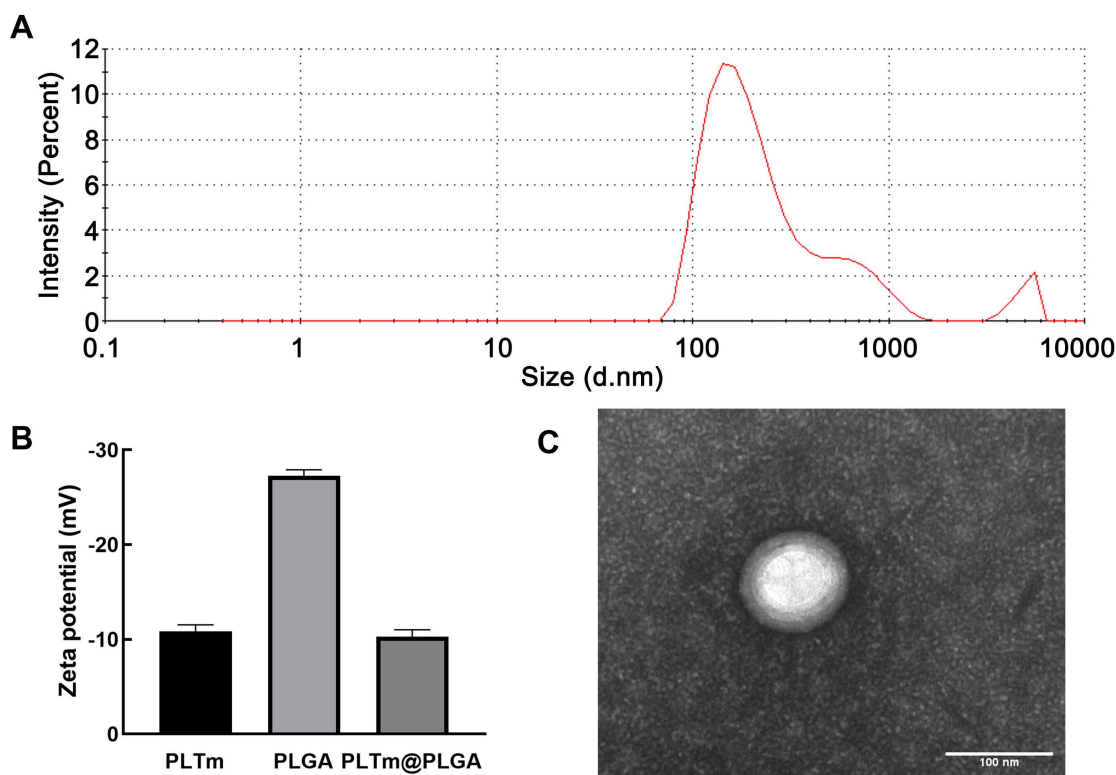
实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间差异的显著性采用 t 检验。3 组或 3 组以上差异的显著性采用单因素

方差分析。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 实验重复 3 次以确保准确性。

### 3. 结果

#### 3.1. PLTm@PLGA 的表征

通过粒度电位分析仪检测 PLTm@PLGA 粒径大小为  $234.3 \pm 8.9$  nm, 粒径分布如图 1(A)所示, PLTm@PLGA 粒径大小适宜且大多集中分布。图 1(B)显示分离纯化的血小板细胞膜表面电荷为  $-10.1 \pm 1.4$  mV, PLGA 纳米颗粒表面电荷  $-27.3 \pm 1.6$  mV, PLTm@PLGA 表面电荷为  $-10.3 \pm 1.7$  mV。PLGA 在包覆血小板细胞膜后表面 Zeta 电荷与血小板细胞膜表面 Zeta 电荷无差异, 说明已将血小板细胞膜成功包覆在 PLGA 表面。为进一步验证 PLTm@PLGA 制备成功, 通过 TEM 观察到特征性“壳-核”结构(图 1(C))。

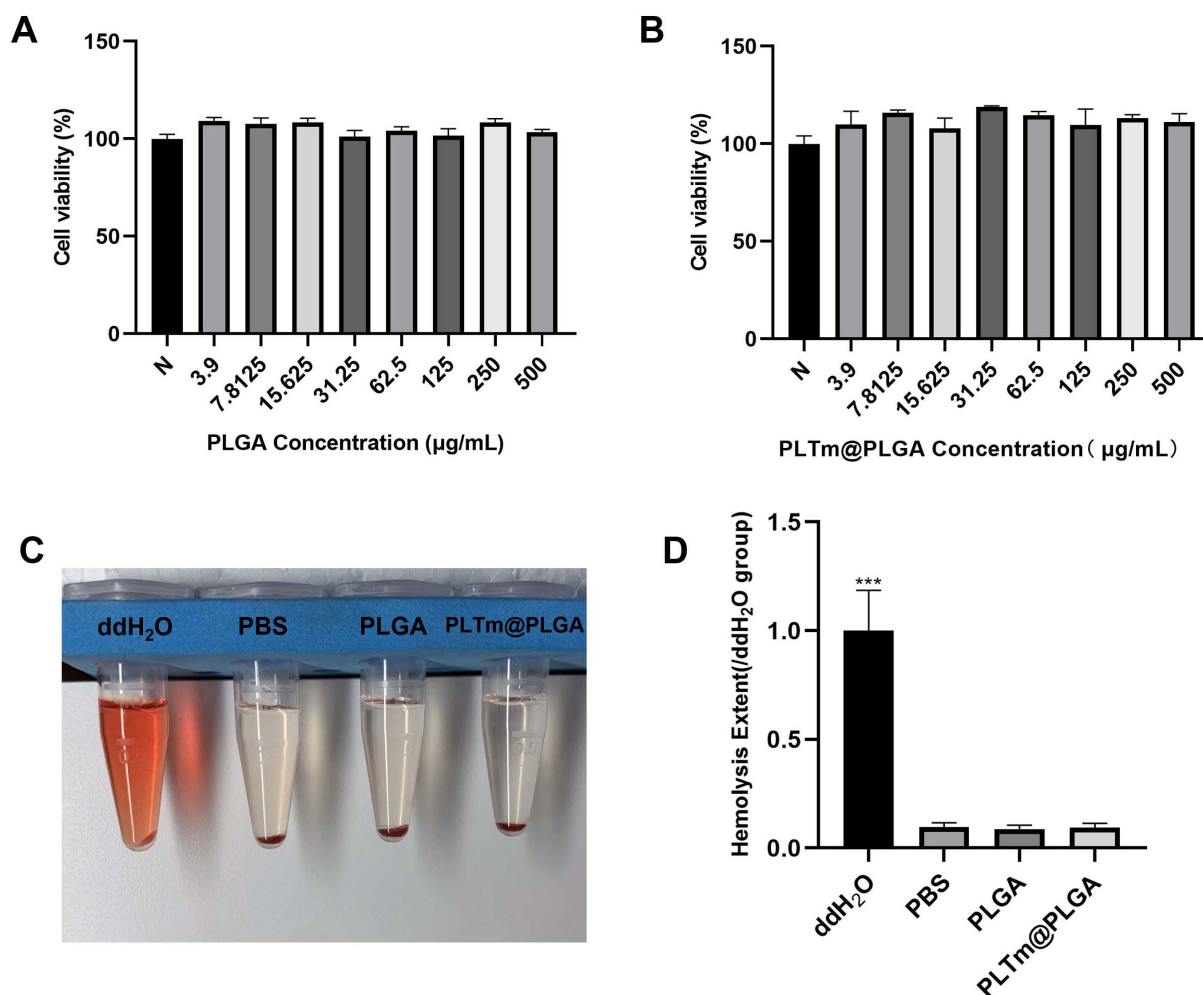


**Figure 1.** Particle size (A), Zeta potential (B), TEM (C) of PLTm@PLGA

**图 1.** PLTm@PLGA 的粒径(A)、表面 Zeta 电位(B)、TEM(C)

#### 3.2. PLTm@PLGA 安全性评估

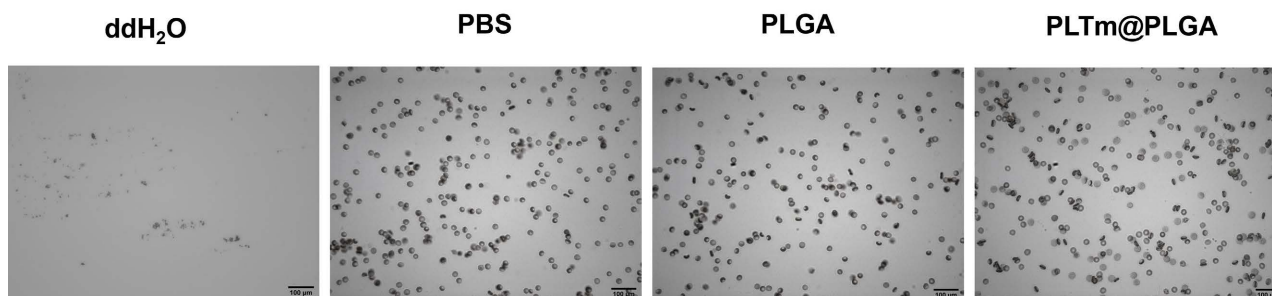
首先, 使用不同浓度的(0, 3.906, 7.813, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 PLGA、PLTm@PLGA 与 RAW264.7 细胞共培养, 检测 PLGA、PLTm@PLGA 在体外的细胞毒性。CCK-8 (图 2(A)、图 2(B))结果显示各浓度下均未对 RAW264.7 细胞活力产生影响。为了进一步证实 PLGA、PLTm@PLGA 的血液相容性, 我们利用健康 C57BL/6 小鼠红细胞进行溶血试验。PBS 混合的红细胞作为阴性对照组, ddH<sub>2</sub>O 混合的红细胞作为阳性对照组。与阴性对照组相比较, 可以直观看到上清液充满由于红细胞破裂而溢出的血红素, 出现显著的溶血现象。PLGA、PLTm@PLGA 处理组上清液与阴性对照组相一致, 上清液几乎透明, 均未出现溶血现象。将上清液取样, 通过酶标仪检测结果(图 2(D))与图 2(C)一致, 阳性对照组出现显著的溶血现象, PLGA、PLTm@PLGA 处理组均未出现溶血现象。



**Figure 2.** The cytotoxicity of different concentrations of PLGA (A) and PLTm@PLGA (B) on RAW264.7 cells and the hemolysis of red blood cells (C, D)

**图 2.** 不同浓度 PLGA (A)、PLTm@PLGA (B)对 RAW264.7 细胞毒性以及对红细胞溶血情况(C, D)考察

同时，在光学显微镜下对不同处理组的红细胞形态进行观察记录。如图 3 所示，由 ddH<sub>2</sub>O 处理的阳性对照组，镜下未观察到完整红细胞形态，红细胞完全被破坏，有少量的细胞碎片，而 PBS 处理的红细胞显示出正常的双面凹圆盘形态。PLGA、PLTm@PLGA 处理组红细胞膜完整，形态正常。总之，这些结果表明仿生纳米系统具有良好的生物相容性和生物安全性。

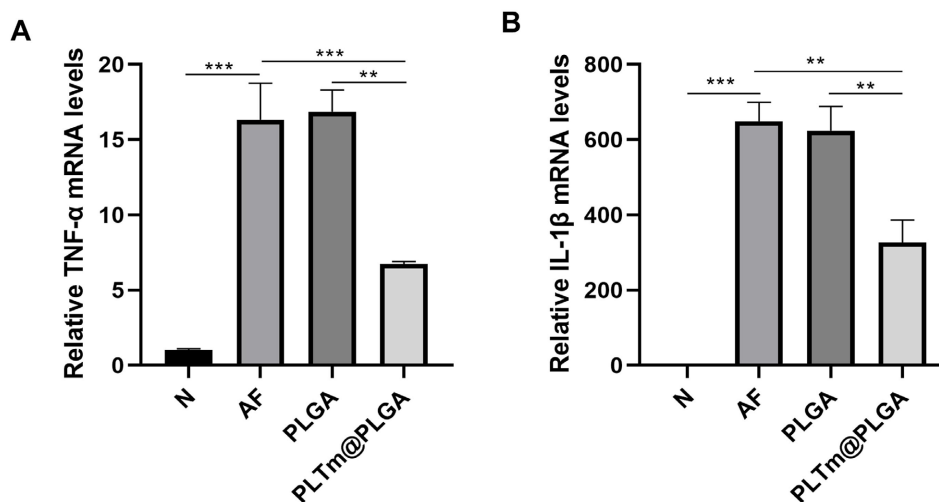


**Figure 3.** Morphology of red blood cells in ddH<sub>2</sub>O, PBS, PLGA and PLTm@PLGA groups under light microscope

**图 3.** 光学显微镜下 ddH<sub>2</sub>O、PBS、PLGA、PLTm@PLGA 组红细胞形态

### 3.3. PLTm@PLGA 对 RAW264.7 中 AF 诱导炎症的影响

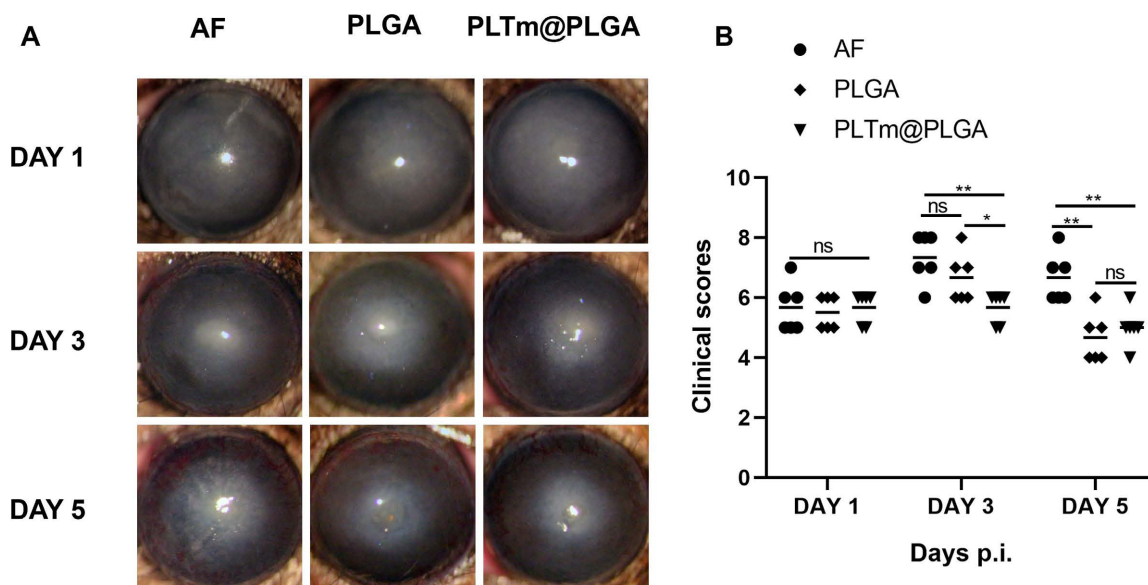
如图 4(A)、图 4(B)所示, 灭活菌丝刺激 RAW264.7 细胞后, PLGA 处理组中炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  表达与 AF 组无显著差异, 而经过 PLTm@PLGA 处理后炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  表达显著降低。结果表明, PLTm@PLGA 具有抑炎作用。



**Figure 4.** The mRNA expression levels of inflammatory cytokines  
**图 4.** 各组炎症因子 mRNA 表达水平

### 3.4. PLTm@PLGA 减轻小鼠烟曲霉菌性角膜炎临床评分

裂隙显微镜下观察小鼠角膜感染烟曲霉菌后第 1、3、5 天的角膜炎程度(图 5(A))。感染烟曲霉菌后第 1 天, 各组小鼠角膜炎严重程度无明显差异。与 AF 组相比, 感染后第 3、5 天, PLTm@PLGA 处理组溃疡面积和混浊程度显著减轻, 炎症临床评分显著下降(图 5(B)), 差异具有统计学意义。



**Figure 5.** The anterior segment photographs (A) and clinical scores (B) on day 1, 3 and 5 after AF keratitis in mice  
**图 5.** 小鼠角膜感染 AF 后第 1、3、5 天的眼前节照相(A)以及炎症临床评分(B)

## 4. 讨论

FK 是一种由致病真菌感染引起的具有较高致盲率的疾病[18]。真菌定植角膜损伤部位后孢子萌发形成菌丝, 以及真菌产生的毒力因子破坏角膜组织。真菌的侵袭激活宿主固有免疫以清除真菌, 而过度的炎症反应导致炎症因子和细胞毒性物质大量积累, 从而影响 FK 预后。血小板细胞膜仿生纳米系统是一种基于细胞膜和生物材料设计纳米颗粒, 在减轻炎症方面显示出巨大潜力。

本研究分离血小板细胞膜, 并将其包被在 PLGA 表面成功制备出血小板细胞膜仿生纳米系统。由脂质和蛋白质组成的细胞膜与纳米内核相比具有不同的密度, 因此 TEM 是作为对其结构表征的金标准[19]。TEM 下观察到 PLTm@PLGA 具有特征性的“壳-核”结构。

血小板细胞是天然血细胞, 具有良好的生物相容性。PLGA 同样具有优异的生物相容性和生物降解性, 其在体内水解成乳酸和乙醇酸, 通过三羧酸循环代谢成水和二氧化碳, 最终排出体外[20]。本研究中, CCK-8 及溶血试验显示 PLTm@PLGA 具有良好生物相容性。

此外, 血小板功能包括具有病原体、炎症部位的亲和力, 血小板细胞膜显示出优于其他细胞膜的潜在优势[14] [21]。一系列证据证实, 血小板与吞噬细胞具有相同的表面抗原, 如 C 反应蛋白受体[22]、血小板反应蛋白受体 CD36 (血小板 GPIV) [23]等。血小板还表达补体 CR3 受体[24], 即补体结合的 C3a 和 C5a 产物的受体, 以类似于白细胞的方式感知并响应炎症细胞因子, 如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等[25]。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  均为促炎细胞因子, 主要是由巨噬细胞和单核细胞产生, 在感染、炎症性疾病中发挥重要的免疫功能[26]。已有多项研究指出, 在真菌性角膜炎中, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症细胞因子增加释放参与炎症反应, 抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  炎症细胞因子的表达可以减轻真菌性角膜炎的炎症反应[27] [28]。在本研究中, PLTm@PLGA 处理显著降低了 RAW264.7 细胞中炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的表达, 从而发挥抗炎作用。

过度的炎症反应会造成角膜组织蛋白质沉淀, 加重混浊, 组织损伤严重[29]。本研究建立烟曲霉菌性角膜炎小鼠模型, 分别在 1、3、5 天观察角膜状况, 并根据炎症临床评分标准进行评分。结果显示, PLTm@PLGA 处理的小鼠角膜混浊减轻, 溃疡面积减小, 炎症临床评分显著下降。

## 5. 结论

综上所述, 本研究成功制备了生物相容的血小板细胞膜仿生纳米系统。体外研究证实其抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  表达, 发挥抗炎作用, 在体内减轻烟曲霉菌性角膜炎的炎症反应。后续将进一步探究该系统在真菌性角膜炎中递送药物的治疗效果。

## 参考文献

- [1] 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)
- [2] Qiu, S., Zhao, G.-Q., Lin, J., *et al.* (2015) Natamycin in the Treatment of Fungal Keratitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Ophthalmology*, **8**, 597-602.
- [3] Ahmadikia, K., Aghaei Gharehbolagh, S., Fallah, B., *et al.* (2021) Distribution, Prevalence, and Causative Agents of Fungal Keratitis: A Systematic Review and Meta-Analysis (1990 to 2020). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **11**, Article ID: 698780. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.698780>
- [4] Khani, S., Seyedjavadi, S.S., Hosseini, H.M., *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>
- [5] Jin, H., Luo, R., Li, J., *et al.* (2022) Inhaled Platelet Vesicle-Decoyed Biomimetic Nanoparticles Attenuate Inflammatory Lung Injury. *Frontiers in Pharmacology*, **13**, Article ID: 1050224. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1050224>
- [6] Jin, H., Li, J., Zhang, M., *et al.* (2021) Berberine-Loaded Biomimetic Nanoparticles Attenuate Inflammation of Experimental Allergic Asthma via Enhancing IL-12 Expression. *Frontiers in Pharmacology*, **12**, Article ID: 724525. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.724525>



- [7] Robert, R., Nail, S., Marot-Leblond, A., *et al.* (2000) Adherence of Platelets to *Candida* Species *in Vivo*. *Infection and Immunity*, **68**, 570-576. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.570-576.2000>
- [8] Rambach, G., Blum, G., Latgé, J.-P., *et al.* (2015) Identification of *Aspergillus fumigatus* Surface Components That Mediate Interaction of Conidia and Hyphae with Human Platelets. *The Journal of Infectious Diseases*, **212**, 1140-1149. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv191>
- [9] Fitzgerald, J.R., Foster, T.J. and Cox, D. (2006) The Interaction of Bacterial Pathogens with Platelets. *Nature Reviews. Microbiology*, **4**, 445-457. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1425>
- [10] Kim, J.-K., Uchiyama, S., Gong, H., *et al.* (2021) Engineered Biomimetic Platelet Membrane-Coated Nanoparticles Block *Staphylococcus aureus* Cytotoxicity and Protect against Lethal Systemic Infection. *Engineering*, **7**, 1149-1156. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.09.013>
- [11] Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J.M., *et al.* (2012) PLGA-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications. *Journal of Controlled Release*, **161**, 505-522. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>
- [12] Ding, D. and Zhu, Q. (2018) Recent Advances of PLGA Micro/Nanoparticles for the Delivery of Biomacromolecular Therapeutics. *Materials Science and Engineering: C*, **92**, 1041-1060. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.036>
- [13] Katara, R., Sachdeva, S. and Majumdar, D.K. (2017) Enhancement of Ocular Efficacy of Aceclofenac Using Biodegradable PLGA Nanoparticles: Formulation and Characterization. *Drug Delivery and Translational Research*, **7**, 632-641. <https://doi.org/10.1007/s13346-017-0416-1>
- [14] Hu, C.-M.J., Fang, R.H., Wang, K.-C., *et al.* (2015) Nanoparticle Biointerfacing by Platelet Membrane Cloaking. *Nature*, **526**, 118-121. <https://doi.org/10.1038/nature15373>
- [15] Sharma, S., Parmar, A., Kori, S., *et al.* (2016) PLGA-Based Nanoparticles: A New Paradigm in Biomedical Applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **80**, 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.06.014>
- [16] Liu, X., Sui, J., Li, C., *et al.* (2023) The Preparation and Therapeutic Effects of  $\beta$ -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>
- [17] 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>
- [18] Kredics, L., Narendran, V., Shobana, C.S., *et al.* (2015) Filamentous Fungal Infections of the Cornea: A Global Overview of Epidemiology and Drug Sensitivity. *Mycoses*, **58**, 243-260. <https://doi.org/10.1111/myc.12306>
- [19] Hu, C.-M.J., Zhang, L., Aryal, S., *et al.* (2011) Erythrocyte Membrane-Camouflaged Polymeric Nanoparticles as a Biomimetic Delivery Platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 10980-10985. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106634108>
- [20] Jan, N., Madni, A., Khan, S., *et al.* (2022) Biomimetic Cell Membrane - Coated Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles for Biomedical Applications. *Bioengineering & Translational Medicine*, **8**, e10441. <https://doi.org/10.1002/btm2.10441>
- [21] Jin, H., Zhao, Y., Yao, Y., *et al.* (2023) Therapeutic Effects of Tea Polyphenol-Loaded Nanoparticles Coated with Platelet Membranes on LPS-Induced Lung Injury. *Biomaterials Science*, **11**, 6223-6235. <https://doi.org/10.1039/D3BM00802A>
- [22] Bout, D., Joseph, M., Pontet, M., *et al.* (1986) Rat Resistance to Schistosomiasis: Platelet-Mediated Cytotoxicity Induced by C-Reactive Protein. *Science*, **231**, 153-156. <https://doi.org/10.1126/science.3079916>
- [23] Ockenhouse, C.F., Magowan, C. and Chulay, J.D. (1989) Activation of Monocytes and Platelets by Monoclonal Antibodies or Malaria-Infected Erythrocytes Binding to the CD36 Surface Receptor *in Vitro*. *Journal of Clinical Investigation*, **84**, 468-475. <https://doi.org/10.1172/JCI114188>
- [24] Cosgrove, L.J., Apice, A.J., Haddad, A., *et al.* (1987) CR3 Receptor on Platelets and Its Role in the Prostaglandin Metabolic Pathway. *Immunology Cell Biology*, **65**, 453-460. <https://doi.org/10.1038/icb.1987.54>
- [25] Yeaman, M.R. (2010) Platelets in Defense against Bacterial Pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**, 525-544. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0210-4>
- [26] Viriyakosol, S., Fierer, J., Brown, G.D., *et al.* (2005) Innate Immunity to the Pathogenic Fungus *Coccidioides posadasii* Is Dependent on Toll-Like Receptor 2 and Dectin-1. *Infection and Immunity*, **73**, 1553-1560. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1553-1560.2005>
- [27] Zhan, L., Peng, X., Lin, J., *et al.* (2020) Honokiol Reduces Fungal Load, Toll-Like Receptor-2, and Inflammatory Cytokines in *Aspergillus fumigatus* Keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **61**, 48. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.4.48>
- [28] Zhu, Y., Peng, X., Zhang, Y., *et al.* (2021) Baicalein Protects against *Aspergillus fumigatus* Keratitis by Reducing Fungal Load and Inhibiting TSLP-Induced Inflammatory Response. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **62**,

26. <https://doi.org/10.1167/iops.62.6.26>
- [29] 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/iops.63.12.12>