

【实验研究】

替加环素/壳聚糖纳米粒对碱烧伤角膜新生血管的作用[△]

马高阳 蔡岩 李文静 吴华蓉 王慧娴 高晓唯

作者单位:832000 新疆维吾尔自治区石河子市,石河子大学(马高阳,吴华蓉);830000 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市,新疆军区总医院(高晓唯,蔡岩,李文静,王慧娟)

1.2.1 TGC/CS 纳米粒的制备 将 CS 粉末溶于体积分数 1% 冰醋酸制得 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CS 溶液后用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 调节 pH 值为 5.0, 恒温磁力搅拌状况下逐滴加入 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三聚磷酸钠 (Tripolyphosphate, TPP), 使 CS 与 TPP 的质量比分别为

纳米粒具有较大的表面积使物质能够高效、快速并持续渗透“生物膜”。壳聚糖(chitosan, CS)是甲壳素脱 N-乙酰基而产生的一种多糖,不仅无过敏性和毒性,而且还具有抗菌活性、生物相容性和生物黏附性等。因此,CS 在多个行业中具有潜在

5:1, 4:1, 3:1, 5:2, 2:1, 室温下 $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌 40 min, 静置并观察混悬液状态, 最终选定质量比为 4:1, 即可得到空白 CS 纳米粒。将不同质量 TGC 粉末加入上述 $1.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CS 溶液, TGC 初始浓度分别为 $0.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 其余步骤相同, 可制得不同初始浓度的 TGC/CS 纳米粒。使用冷冻干燥机将所有纳米粒制成冻干粉保存。

1.2.2 TGC/CS 纳米粒包封率、载药量的测算 精密称取一定量的冻干粉复溶后于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心分离 30 min, 取其上清液通过高效液相色谱 (HPLC) 法测量其浓度, 并计算其包封率及载药量。进行 3 次实验取平均值。包封率 = 包封 TGC 的量 (mg)/体系中 TGC 的总量 (mg) $\times 100\%$; 载药量 = 包封 TGC 的量 (mg)/(TGC/CS) 纳米粒总质量 (mg) $\times 100\%$

1.2.3 TGC/CS 纳米粒体外释药的测算 将冻干粉复溶于 1 mL PBS 的离心管中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下持续振荡, 每隔 6 h 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心分离 30 min, 收集并更换上清液, HPLC 法测定其中 TGC 含量。进行 3 次实验取平均值。

1.2.4 色谱条件 色谱柱 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 ($250.0\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$), 流动相 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二铵-三乙胺-甲醇 (67:1:32, pH 6.3), 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 流速 $1\text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检测波长为 245 nm。

1.2.5 TGC/CS 纳米粒表征、粒径的检测 将冻干粉用去离子水复溶后, 滴于喷碳铜网 (200 孔) 上, 白炽灯下烘干后于透射电镜下观察纳米粒的形状、分布并测量其粒子直径。

1.2.6 TGC/CS 纳米粒眼表毒性检测 随机选取 6 只新西兰大白兔, 右眼为实验眼, 左眼为对照眼。将纳米粒混悬液 $50\text{ }\mu\text{L}$ 滴于右眼结膜囊, 等量生理盐水滴于左眼结膜囊。1 h、6 h、24 h 后用裂隙灯观测角膜、虹膜、结膜及巩膜等情况, 根据 Draize 兔眼刺激实验评分, 即在一侧结膜囊滴入受试物后在规定的间隔时间观察兔眼的刺激及腐蚀程度, 并根据量表对角膜、虹膜及结膜进行量化评分, 将所有动物的刺激反应评分相加后除以动物数, 即为最终分值。于 24 h 后戊巴比妥钠麻醉下空气栓塞处死, 取两眼的角膜及结膜行 HE 染色观察其形态及炎症细胞的表达等。

1.2.7 建立碱烧伤模型、分组用药、裂隙灯观察并定量计算 CNV 面积 取 40 只新西兰大白兔随机分为 TGC/CS 纳米粒组 (A 组)、TGC 组 (B 组)、空白 CS 纳米粒组 (C 组) 和生理盐水对照组 (D 组), 每组均为 10 只。兔右眼建立碱烧伤模型, 于实验兔耳缘静脉注入戊巴比妥钠并于眼表滴加盐酸奥布卡因充分麻醉, 将浸泡于 $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液中且直径为 6 mm 圆形滤纸片置于兔右眼角膜 30 s 后, 用足量生理盐水冲洗角膜及结膜囊 5 min, 左眼

不作任何处理。然后 A、B、C、D 组分别使用 TGC/CS 纳米粒、TGC、CS 纳米粒、生理盐水滴右眼, 每日 2 次, 共进行 28 d。使用裂隙灯直接观察角膜情况, 于 7 d、14 d、28 d 测量各组 CNV 长度。CNV 面积的计算公式: $\text{CNV 面积}(\text{mm}^2) = C/12 \times \pi \times [R^2 - (R-L)^2]$, 其中 C 为 CNV 累及的角膜的圆周钟点数, π 为圆周率取 3.14, L 为 CNV 从角膜缘深入角膜的长度, 兔眼的角膜半径 $R = 7\text{ mm}$ 。

1.2.8 组织病理切片 HE 染色 分别于 7 d、14 d 及 28 d 时使用戊巴比妥钠麻醉, 空气栓塞处死各组实验兔, 对取得的角膜组织进行福尔马林溶液固定、石蜡包埋和切片等常规组织学方法处理。再对切片进行苏木精和伊红染色后封片, 光镜观察角膜结构、新生血管和细胞浸润情况等。

1.2.9 Western blot 检测 NF- κ B、VEGF、MMP-9 蛋白的表达 称取约 0.1 mg 角膜组织, 液氮研磨后加入 $1000\text{ }\mu\text{L}$ 裂解液冰上裂解 2 h, 检测各组蛋白含量并配平。低温高速离心后取上清液等比例加入上样缓冲液, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 取上清液上样, 凝胶电泳, 然后转印到 PVDF 膜上。用 TBST 缓冲液配置 $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛血清蛋白 (BSA) 稀释抗体原液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 隔夜孵育一抗, 次日室温下 2 h 孵育二抗。将电化学发光液 (ECL) 中的 A 液和 B 液等比例混合均匀滴注于膜上, 分析目的条带灰度值。

1.3 统计学分析 本实验数据使用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析, 计量资料采用均数 \pm 标准差表示, 组间比较使用单因素方差分析 (ANOVA)。检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 TGC/CS 纳米粒表征分析 不同初始 TGC 浓度所得包封率及载药量的结果显示, $2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 TGC/CS 纳米粒包封率 ($67.17 \pm 0.29\%$) 与载药量 ($59.67 \pm 0.29\%$) 最高, 因此, 选择该浓度作为 TGC 的初始浓度制备 TGC/CS 纳米粒。透射电镜结果显示, $2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TGC/CS 纳米粒外观为光滑球形结构, 纳米粒间未见粘连, 粒径大小分布均匀, 粒径为 (235.84 ± 34.59) nm (见图 1)。

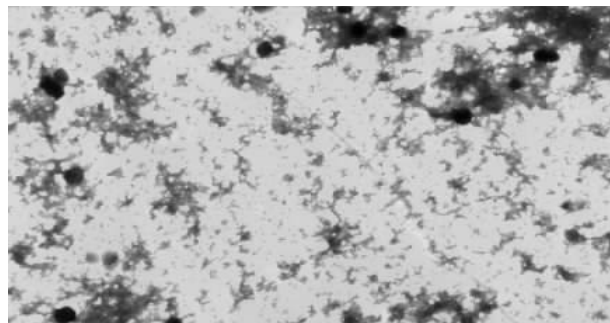


图 1 透射电镜下 TGC/CS 纳米粒形态

2.2 TGC/CS 纳米粒体外释药 TGC/CS 纳米粒在体外存在明显的突释现象,18 h 释放量约占总量的70%,18~48 h 为缓释状态,48 h 后药物几乎完全释放(见图2)。

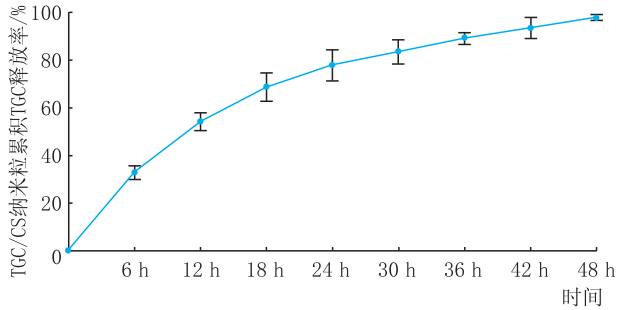


图2 TGC/CS 纳米粒累积释放 TGC 曲线

2.3 眼表毒性检测 裂隙灯显微镜观察结果显示,各时间点观察均未见角膜混浊、虹膜异常、结膜充血水肿、巩膜异常及分泌物增多等情况,Draize 评分为0。HE 染色结果显示,实验眼较对照眼的角膜、结膜未见明显改变,角膜、结膜上皮细胞完整且紧密连接,各层结构清晰,未见水肿及炎细胞浸润(见图3)。

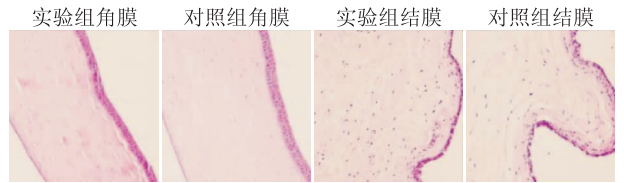


图3 HE 染色下兔实验眼与对照眼角膜与结膜组织病理学观察(×400)

2.4 角膜大体观察及 CNV 面积测量 裂隙灯显微镜结果显示,碱烧伤后前3 d,烧伤区呈灰白色,边界清晰、角膜水肿、睫状充血。碱烧伤后4 d,角膜周边始见新生血管出现,此时 CNV 分布稀疏、管径细小,各组无明显差异。碱烧伤后7 d,CNV 生长迅速,C、D 组 CNV 分布范围广,管径较粗且顶部出现分叉,A、B 组管径较小,顶部分叉较少,且角膜上皮损伤处基本愈合。碱烧伤后14 d,D 组 CNV 形成较为致密的网状结构,分布面积进一步增大,长度已趋于角膜中央,C 组管径及分布面积小于 D 组,B 组 CNV 明显小于 C、D 两组,尤其 A 组的 CNV 稀疏细小。碱烧伤后28 d,各组 CNV 管径变细、面积减小,但 C、D 组依然大于 B 组,而 A 组部分已萎缩消退(见图4)。角膜碱烧伤后7 d、14 d 及28 d,C 组 CNV 面积均小于 D 组,但差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$),其余各组 CNV 面积的差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)(见表1)。

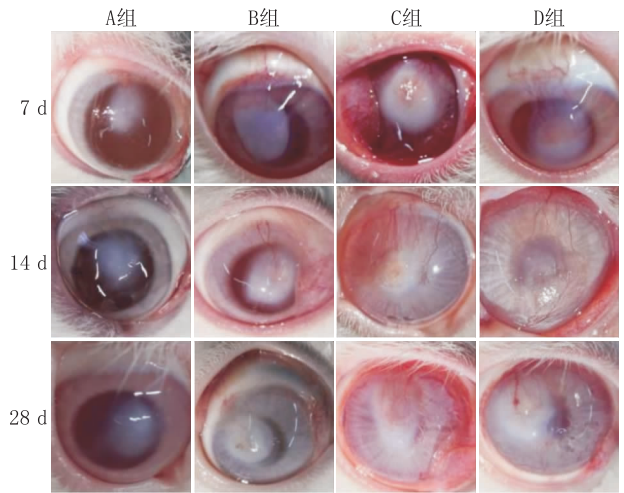


图4 各组角膜碱烧伤后7 d、14 d 和28 d 照片

表1 各组不同时间点 CNV 面积

组别	CNV 面积/mm ²		
	7 d	14 d	28 d
A 组	5.99 ± 1.05	12.35 ± 1.96	13.07 ± 3.93
B 组	15.17 ± 2.77 ^a	23.85 ± 2.42 ^a	23.88 ± 2.97 ^a
C 组	23.85 ± 5.43 ^{ab}	40.02 ± 2.62 ^{ab}	38.84 ± 6.30 ^{ab}
D 组	24.32 ± 5.68 ^{ab}	42.76 ± 4.66 ^{ab}	41.54 ± 4.97 ^{ab}

注:与 A 组比较,^a $P < 0.05$;与 B 组比较,^b $P < 0.05$

2.5 组织学检测 病理切片 HE 染色结果显示,碱烧伤后7 d 各组角膜上皮仍有不同程度缺损,基质层水肿,胶原纤维排列疏松且紊乱,炎症细胞浸润,少量新生血管生成,其中 C、D 两组炎症较 B 组严重,B 组较 A 组严重。碱烧伤后14 d 角膜上皮愈合,基质浅层溃疡形成,各层排列基本恢复正常,C、D 两组见大量新生血管生成,管径较粗,管腔内见红细胞,B 组炎细胞、新生血管数量及管径均较小,A 组最小。碱烧伤后28 d 各组角膜上皮完整,基质胶原纤维整齐排列,仅见少量炎症细胞浸润,新生血管分布减少,管径缩小,仍然是 C、D 两组炎症程度最重,B 组居中,A 组角膜结构接近正常(见图5)。

2.6 Western blot 检测各组 NF- κ B、MMP-9、VEGF 蛋白相对表达量 A、B、C、D 组 NF- κ B 蛋白的相对表达量分别为 0.36 ± 0.01 、 0.55 ± 0.03 、 0.77 ± 0.02 、 0.97 ± 0.03 ,MMP-9 蛋白的相对表达量依次为 0.29 ± 0.02 、 0.40 ± 0.02 、 0.53 ± 0.02 、 0.68 ± 0.01 ,A、B、C、D 组 NF- κ B 与 MMP-9 蛋白的相对表达量均依次递增,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。A、B、C、D 组 VEGF 蛋白的相对表达量依次为 0.38 ± 0.02 、 0.45 ± 0.01 、 0.76 ± 0.02 、 0.77 ± 0.02 ,C、D 两组间差异无统计学意义($P < 0.05$),其余各组两两相比差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)(见图6)。

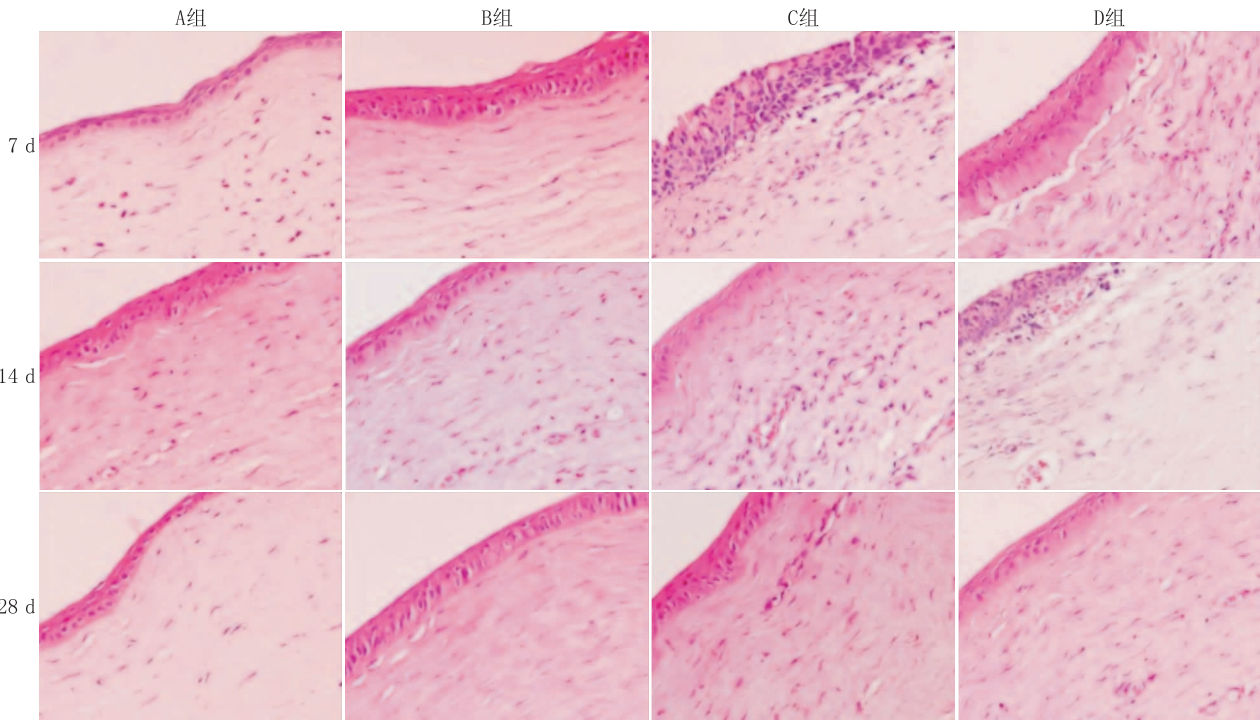


图5 各组病理切片 HE 染色结果 (×400)

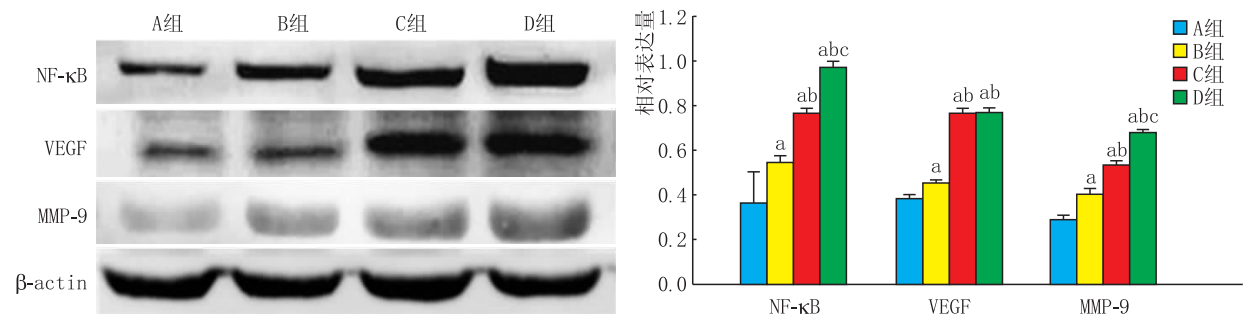


图6 Western blot 检测各组 NF-κB、MMP-9、VEGF 蛋白相对表达量 与 A 组比较,^a $P < 0.05$; 与 B 组比较,^b $P < 0.05$; 与 C 组比较,^c $P < 0.05$

3 讨论

碱烧伤的早期即可因为角膜组织的坏死及炎症反应导致角膜发生损伤, 损伤的角膜组织在修复过程中, 由于瘢痕化和 CNV, 致使角膜组织的透明度下降, 视力受损^[7]。迄今为止, 尚未见到国内外有文献报道关于 CNV 的特异性治疗方式^[8]。CNV 是一个含有多种炎症细胞和细胞因子参与的病理修复过程, 如 VEGF、MMPs、炎性细胞因子等均与之相关, 因此, 寻找抑制血管生成和炎症的药物是治疗 CNV 的重要策略之一^[9]。

四环素是第二代长效非选择性抗生素, 外用可抑制角膜溶解, 治疗感染性角膜疾病^[10], 此外, 四环素及其衍生制品被证明可加速角膜伤口愈合, 抑制 CNV 形成^[11]。TGC 是四环素家族中较新较强效的

一种制剂, Goktas 等^[12]首次探讨了 TGC 抑制 CNV 的疗效, 发现局部应用 TGC 后, CNV 明显减少。CS 是甲壳素 N-脱乙酰基而产生的一种多糖^[13], 壳聚糖及其衍生物具有良好的生物相容性、可溶性和可增强分子在上皮层间的渗透性等优势^[14]。纳米粒可以提高药物对角膜的穿透性、可使药物在眼表的停留时间延长、延缓药物降解和代谢以增强药物的稳定性, 且纳米粒的毒性和副作用低, 保质期长, 是适用于眼科局部给药的新剂型^[15-16]。本研究使用 CS 纳米粒负载 TGC, 在发挥其载体优势的基础上, 尚有如抑菌、止血、抗纤维化、辅助免疫、抗肿瘤和促进伤口愈合等 CS 自身优势^[17]。已有研究探讨了 CS 纳米粒在角膜碱烧伤方面的应用, Roy 等^[18]合成了以 α -平滑肌肌动蛋白抗体为靶点的负载曲古抑菌素 A 和显性负性 Survivin 蛋白超小壳聚糖纳米粒用于碱

烧伤的治疗。CS 纳米粒及其衍生物还广泛应用于其他眼科疾病,如青光眼^[19]、眼部感染及炎症^[20]、眼底疾病^[21]等。

VEGF 是影响内皮细胞生长、存活、通透性、迁移和血管重塑的最重要的促血管生成因子。该因子在组织缺氧状态下表达,并附着在内皮细胞表面的受体上,诱导上述活动的发生。VEGF 可由内皮细胞、巨噬细胞、T 细胞和星形胶质细胞分泌^[22]。VEGF-A 被认为是这个家族中最重要的成员,特别是与病理血管生成有关^[5]。VEGF-A 是由角膜上皮细胞、血管内皮细胞和浸润性白细胞分泌的,是炎症和血管生成的主要介质,它破坏血管壁并刺激新生血管的生长,在新生血管形成的早期表达上调^[23-24]。

正常情况下,MMPs、基质金属蛋白酶组织抑制剂和整合素三者处于相对平衡的状态。病理性新生血管生成始于这种平衡的破坏,细胞外基质的降解被认为是发展新血管的重要组成部分^[25]。MMPs 是一类重要的金属蛋白酶,其中 MMP-9 也被称为明胶 B,在组织重组和血管生成过程中起关键作用^[23]。四环素及其衍生物可通过抑制 MMP-9 来增加色素上皮源性生长因子的表达,从而使得 VEGF 的表达下调,可减少新生血管的形成降低角膜通透性;亦可改善减少睑板腺功能,从而恢复泪膜和角膜的光学质量^[26]。

NF- κ B 参与了基因转录,有文献报道其参与免疫调节、炎症反应以及细胞凋亡等多种反应^[27]。NF- κ B 在转录水平控制着包括 VEGF 在内的多种促血管生成的因子,可在上游作为靶点控制 VEGF 的表达^[28]。同时 VEGF 可以反向上调 NF- κ B 的表达从而形成闭合环路,正反馈增加新生血管的生成^[29]。研究报道,MMP-9 是 NF- κ B 的基因靶点之一,NF- κ B 的过度激活会引起 MMP-9 的表达增加^[30]。本研究已证实 TGC 可有效抑制 NF- κ B 的表达。

CNV 生成的病理过程分为两个方面,一是血管生成生长因子依赖的血管内皮细胞增殖,另一方面是细胞外基质成分的重构和细胞因子的激活^[31],本实验中,TGC/CS 纳米粒被证实可通过抑制 NF- κ B、VEGF 和 MMP-9 的表达同时抑制上述两个方面的病理过程,且 TGC/CS 纳米粒组较游离 TGC 组抗新生血管能力明显增强,证实 TGC/CS 纳米粒是防治碱烧伤 CNV 的潜在用药。

参考文献

[1] FRIEDMAN M, AZRAD-LEBOVITZ T, MORZAEV D, ZAHAVI A, MARIANAYAGAM N J, NICHOLSON J D, et al. Protective effect of TLR4 ablation against corneal neovascularization following chemical burn in a mouse model [J]. *Curr Eye Res*, 2019, 44(5):505-513.

[2] BENAYOUN Y, CASSE G, FORTE R, DALLAUDIÈRE B, ADE-NIS J P, ROBERTET P Y. Corneal neovascularization: epidemiological, physiopathological, and clinical features [J]. *J Fr Ophthalmol*, 2013, 36(7):627.

[3] FEIZI S, AZARI A A, SAFAPOUR S. Therapeutic approaches for corneal neovascularization [J]. *Eye Vis*, 2017, 4(1):28.

[4] 温舒, 杨炜. 氢气水对大鼠碱烧伤角膜新生血管抑制作用的研究 [J]. *眼科新进展*, 2018, 38(1):39-43.

WEN S, YANG W. Inhibitory effects of hydrogen on corneal neovascularization in rats with alkali burn [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2018, 38(1):39-43.

[5] VOICULESCU O B, VOINEA L M, ALEXANDRESCU C. Corneal neovascularization and biological therapy [J]. *J Med Life*, 2015, 8(4):444-448.

[6] SEDEFI I, NECDET S, MUSTAFA Ö, FEZA K. Chitosan nanoparticles enhances the anti-quorum sensing activity of kaempferol [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 94:653-622.

[7] 马为梅, 李春花, 雷晓琴, 周云云. 注射用盐酸多西环素对兔角膜新生血管的抑制作用 [J]. *眼科新进展*, 2018, 38(12):1123-1128.

MA W M, LI C H, LEI X Q, ZHOU Y Y. Inhibitory effects of doxycycline on rabbit cornea neovascularization [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2018, 38(12):1123-1128.

[8] WU Y, XUE C Y, LU Y, HUANG Z P. The inhibitory effect of different concentrations of KH902 eye drops on corneal neovascularization induced by alkali burn [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 65(11):1127-1132.

[9] NOROOZNEHAD A H, NOROOZNEHAD F, AHMADI K. Next target of tranilast: inhibition of corneal neovascularization [J]. *Med Hypotheses*, 2014, 82(6):700-702.

[10] GOKTAS S, KURTOGLU M G, SAKARYA Y, UGURLUOGLU C, OZCIMEN M, SAKARYA R, et al. New therapy option for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis: tigecycline [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2015, 31(2):122.

[11] SU W R, LI Z R, LIN M L, LI Y P, HE Z X, WU C B, et al. The effect of doxycycline temperature-sensitive hydrogel on inhibiting the corneal neovascularization induced by BFGF in rats [J]. *Graefes Arch Clin Exp*, 2011, 249(3):421-427.

[12] GOKTAS S, ERDOGAN E, SAKARYA R, SAKARYA Y, YILMAZ M, OZCIMEN M, et al. Inhibition of corneal neovascularization by topical and subconjunctival tigecycline [J]. *J Ophthalmol*, 2014, 2014:452685.

[13] PERINELLI D R, FAGIOLI L, CAMPANA R, LAM J K W, BAFFONE W, PALMIERI G F, et al. Chitosan-based nano-systems and their exploited antimicrobial activity [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 117:8-20.

[14] GARCIA-FUENTES M, ALONSO M J. Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? [J]. *J Control Release*, 2012, 161(2):496-504.

[15] 刘思伟, 王群, 康前雁. 荷载 Zebularine 的聚合物胶束复合体纳米颗粒对兔眼晶状体后囊膜混浊的预防作用 [J]. *眼科新进展*, 2015, 35(11):1014-1016.

LIU S W, WANG Q, KANG Q Y. Effects of Zebularine loaded MePEG-PCL nanoparticles on posterior capsule opacification [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2015, 35(11):1014-1016.

[16] JANAGAM D R, WU L, LOWE T L. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 122:31-64.

[17] 何彦津, 林婷婷, 朱利民, 罗浩, 常津, 张虹, 等. 长春新碱靶向缓释微球治疗鼠腺样囊性癌的研究 [J]. *中华眼科杂志*, 2010, 46(9):795-801.

HE Y J, LIN T T, ZHU L M, LUO H, CHANG J, ZHANG H, et al. VCR-loaded nanoparticles as targeted delivery system for the treatment of orbital adenoid cystic carcinoma [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2010, 46(9):795-801.

[18] ROY K, NEERATI P, CHEUNG C H A, KANWAR R K, SANDHIR R, KANWAR J R. Corrigendum: topical ophthalmic formulation of Trichostatin A and SurR9-C84A for quick recovery post-alkali burn of corneal haze [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:1434.

[19] NAZIA K, AMEEDUZZAFAR, KUSHAGRA K, ASEEM B, FARHAN J A, ASGAR A. Chitosan coated PLGA nanoparticles amplify the ocular hypotensive effect of forskolin: statistical design, characterization and *in vivo* studies [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 116:648-663.

[20] CHAVAN C, BLAL P, PAL K, KALE S N. Cross-linked chitosan-dextran sulphate vehicle system for controlled release of ciprofloxacin drug: An ophthalmic application [J]. *Open Nano*, 2017, 2:28-36.

- [21] TAHARA K, KARASAWA K, ONODERA R, TAKEUCHI H. Feasibility of drug delivery to the eye's posterior segment by topical instillation of PLGA nanoparticles [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2017, 12(4): 394-399.
- [22] HOLMES D I, ZACHARY I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease [J]. *Genome Biol*, 2005, 6(2): 209.
- [23] LI Z R, LI Y P, LIN M L, SU W R, ZHANG W X, ZHANG Y, et al. Activated macrophages induce neovascularization through upregulation of MMP-9 and VEGF in rat corneas [J]. *Cornea*, 2012, 31(9): 1028-1035.
- [24] MIRABELLI P, MUKWAYA A, LENNIKOV A, XEROUDAKI M, PEEBO B, SCHAUPPER M, et al. Genome-wide expression differences in anti-VEGF and dexamethasone treatment of inflammatory angiogenesis in the rat cornea [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7616.
- [25] AMBATI J, AMBATI B K, YOO S H, IANCHULEV S, ADAMIS A P. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies [J]. *Surv Ophthalmol*, 2003, 48(3): 257-293.
- [26] FEDERICI T J. The non-antibiotic properties of tetracyclines: clinical potential in ophthalmic disease [J]. *Pharmacol Res*, 2011, 64(6): 614-623.
- [27] LIU W, FAN Z, HAN Y, XU L, WANG M, ZHANG D, et al. Activation of NF- κ B signaling pathway in HSV-1-induced mouse facial palsy: possible relation to therapeutic effect of glucocorticoids [J]. *Neuroscience*, 2015, 289: 251-261.
- [28] FENG Y, DONG X, ZHOU C S, LI S H, YAN X M, DENG Z Q, et al. Dihydroartemisinin targets VEGFR2 via the NF- κ B pathway in endothelial cells to inhibit angiogenesis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(11): 1479-1488.
- [29] 李娟, 罗阿丽, 秦莉. NF- κ B 抑制剂吡咯二硫氨基甲酸酯 (PDTC) 对角膜移植大鼠角膜组织的影响 [J]. *眼科新进展*, 2019, 39(4): 316-320.
- LI J, LUO A L, QIN L. Effect of pyrrolidine dithiocarbamate as an inhibitor of NF- κ B on corneal tissue in rats after corneal transplantation [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2019, 39(4): 316-320.
- [30] 李欣, 张志刚, 孙金豹. Kiss-1、NF- κ B 及 MMP-9 在子宫内膜病变中的作用及关系的研究进展 [J]. *中国社区医师 (医学专业)*, 2011, (36): 238-239.
- LI X, ZHANG Z G, SUN J B. Advances in the role and relationship of Kiss-1, NF- κ B and MMP-9 in endometrial lesions [J]. *Chin Commun Do*, 2011, (36): 238-239.
- [31] XIAO O, XIE Z L, LIN B W, Y X F, PI R B, ZHOU S Y. Minocycline inhibits alkali burn-induced corneal neovascularization in mice [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(7): e41858.

The effect of tigecycline / chitosan nanoparticles on corneal neovascularization after alkali burn

MA Gaoyang¹, CAI Yan², LI Wenjing², WU Huarong¹, WANG Huixian², GAO Xiaowei²

1. Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

2. General Hospital of Xinjiang Military Region, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: GAO Xiaowei, E-mail: gxwgaowx@263.net

[Abstract] Objective To investigate the effect of chitosan (CS) nanoparticles loaded with tigecycline (TGC) on corneal neovascularization after alkali burn. **Methods** We prepare TGC/CS nanoparticles and observe their shape, particle size, and calculate encapsulation efficiency, drug loading and drug release *in vitro*. Six New Zealand white rabbits were selected. The right eye was the subjects and the left eye was the control. New Zealand white rabbits were randomly divided into TGC/CS nanoparticles group (group A), TGC group (group B), blank chitosan (CS) nanoparticles group (group C), and normal saline control group (group D), 10 eyes in each group. TGC/CS nanoparticles, TGC eyes, CS nanoparticles and normal saline were used for group A, B, C, and D, accordingly for 28 days. The corneal neovascularization (CNV) was observed under slit lamp microscope and the length of CNV was measured. HE staining was used to observe the corneal structure, neovascularization and cell infiltration. The expressions of nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B), vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were detected by Western blot. **Results** Most of TGC/CS nanoparticles were regular spheres, with a diameter of (235.84 ± 34.59) nm, a entrapment efficiency of $(67.17 \pm 0.29)\%$ and a drug loading of $(59.67 \pm 0.29)\%$ respectively. The system was stable and had sustained-release function. TGC/CS nanoparticles had no damage to the cornea and conjunctiva of rabbits. The CNV area of group A was significantly less than that of group B, C and D at 7, 14 and 28 days after alkali burn, while group B was significantly less than group C and D, and the differences were statistically significant (all $P > 0.05$), the CNV area of group C was smaller than that of group D but the difference is not statistically significant ($P > 0.05$). HE staining showed that on day 7 after alkali burn, some epithelial cells were damaged, matrix edema, a large number of inflammatory cells infiltrated, and some neovascularization; on day 14 after alkali burn, the corneal structure was partially restored, with a medium amount of inflammatory cells infiltrated, CNV area reached the peak, and on day 28 after alkali burn, the structure of each layer was basically restored, a large number of inflammatory cells were reduced, neovascularization was atrophic, and the inflammation degree of group C and D was the heaviest, group B was in the middle, and group A was the lightest. The results of Western blot showed that the relative expression of NF- κ B and MMP-9 in group A, B, C, and D increased in turn, and the differences were significant (all $P < 0.05$); the relative expression of VEGF in group A was less than that in group B, C and D, and group B was less than that in group C and D, and the differences were significant (all $P < 0.05$), and group C and group D were basically the same. **Conclusion** TGC/CS nanoparticles can reduce the neovascularization in alkali burned cornea by down regulating the expression of NF- κ B, VEGF and MMP-9 in cornea, and they has no harm to the ocular surface.

[Key words] tegcycline/chitosan nanoparticles; corneal alkali burn; corneal neovascularization