

# 替加环素/壳聚糖纳米粒的制备及其兔眼局部应用的研究

马高阳<sup>1</sup> 高晓唯<sup>2</sup>

1. 新疆维吾尔自治区石河子市石河子大学, 新疆 石河子 832000

2. 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市新疆军区总医院眼科, 新疆 乌鲁木齐 830000

**摘要:** 目的: 制备负载替加环素 (Tigecycline, TGC) 的壳聚糖 (Chitosan, CS) 纳米粒用以眼局部应用, 并检测其对兔眼的刺激性。方法: 用离子凝胶法制备 TGC/CS 纳米粒, 透射电镜检测其外形并测量粒径, 高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography HPLC) 法检测并计算其包封率、载药量及体外释药情况。选取 6 只新西兰大白兔, 右眼为实验眼 TGC/CS 纳米粒点眼, 左眼为对照眼, 观察并行 HE 染色及 TUNEL 染色以检测其细胞毒性。结果: TGC/CS 纳米粒大部分呈规则的球形, 包膜完整且表面光滑, (224.84±29.38) nm, 包封率为 (67.92±0.37)%, 载药量为 (59.35±0.30)%, 体系较为稳定有缓释功能。HE 及 TUNEL 染色实验眼于对照眼比较未见明显异常, 即 TGC/CS 纳米粒对兔角膜及结膜无损伤作用。结论: TGC/CS 纳米粒是防治碱烧伤角膜新生血管的潜在用药。

**关键词:** 替加环素; 壳聚糖纳米粒; 眼毒性

## 引言

眼部的药物传递一直是一项艰难且具有挑战性的任务, 美国国家眼科研究所的预测, 随着人口老龄化及其他年龄相关性疾病的出现, 在不同年龄和种族的人群中, 眼部疾病的临床病例将显著增加<sup>[1]</sup>。四环素是一种常见抗生素, 其在眼部疾病的治疗中也有应用, 替加环素是其中一种较新较强的制剂。壳聚糖是甲壳素脱 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、生物相容性和生物粘附性等。因此, 壳聚糖在多个行业中具有潜在的应用价值<sup>[2]</sup>。纳米粒具有较大的表面积使物质能够高效、快速并持续渗透的作用。本研究旨在制备 TGC/CS 纳米粒并探究其特性及细胞毒性。

## 1 材料与仪器

壳聚糖 (索莱宝 c8320)、替加环素 (源叶 S24031)、分析天平 (德国 Sartorius)、LC-20AT 型高效液相色谱仪 (日本岛津)、JEM-1230 透射电子显微镜 (日本 JEOL)。

## 2 实验方法

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (250mm x 4.6mm), 流动相 0.1mol/L 磷酸氢二铵-三乙胺-甲醇(67:1:32, pH6.3), 柱温 30℃, 流速为 1mol/mL, 检测的波长为 245 nm。

### 2.2 TGC/CS 的制备

离子凝胶法: 用分析天平精密称取一定量的 TPP, 将其溶于超纯水中, 制得浓度为 1.0mg/ml 的 TPP 水溶液。用分析天平精密称取一定量的 CS 粉末至于 1% 的冰醋酸溶液中, 制得浓度为 1.0mg/ml 的 CS 溶液, 之后向其中加入 1mol/L 的 NaOH 用以溶液调节 pH 值约为 4.8。在恒温磁力搅拌的条件下, 以 1 滴/s 的速度向 CS 溶液中逐滴加入 TPP 溶液, 直至溶液呈现乳白色珠光样改变, 继续搅拌 30min。在上述条件下, 使得 CS 于 TPP 的治疗比分别为 6:1、5:1、4:1、3:1、2:1, 室温下静止并观察各组混悬液的状态, 最终选定 CS: TPP 为 4:1 时为最佳状态, 即制备得空白 CS 纳米粒。将一定量的 TGC 加入上述 1.0mg/ml 的 CS 溶液中, 其余步骤完全相同, 即可得到负载 TGC 的 CS 纳米粒, 制得 CS 浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mg/ml。使用冷冻干燥机将制得的 TGC/CS 纳米粒以及空白 CS 纳米粒冻干粉备用。

### 2.3 TGC/CS 纳米粒包封率、载药量的计算

精密称取一定量的 TGC/CS 纳米粒冻干粉复溶后, 在 4℃、12000r/min 条件下低温高速离心分离共 30min, 取其上清液通高效液相色谱 (HPLC) 法测量其浓度, 并计算其包封率及载药量。进行 3 次平行试验。

包封率=包封 TGC 的量/体系中 TGC 的总量×100%

载药量=包封 TGC 的量/TGC/CS 纳米粒总质量×100%

### 2.4 TGC/CS 纳米粒体外释药的计算

将上述 TGC/CS 纳米粒冻干粉复溶于盛有 1ml PBS 缓冲液的离心管中, 在 37℃ 水浴的条件下持续保持震荡。每隔 6h, 将其在 4℃、12000r/min 条件下低温高速离心分离共 30min, 收集上清液, 并加入等体积的 PBS 缓冲液持续恒温水浴震荡。将收集的上清液用 HPLC 法测定其中 TGC 含量。进行三次平行试验。

## 2.5 电镜下观察并检测 TGC/CS 纳米粒表征、粒径

将 TGC/CS 纳米粒冻干粉用超纯水复溶后, 滴于喷碳铜网 (200 孔) 上, 在白炽灯下烤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。

## 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, 实验前用裂隙灯显微镜及眼底镜检查眼部情况, 右眼为实验眼, 左眼为对照眼。将纳米粒混悬液 50μL 滴于右眼结膜囊, 等量生理盐水滴于左眼结膜囊。1h、6h 及 24h 后用裂隙灯观测角膜、虹膜、结膜及巩膜等情况, 根据 Draize 测试评分。于 24 小时后戊巴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表达, tunel 染色对比两眼角膜及结膜细胞的凋亡。

## 3 结果

### 3.1 TGC/CS 纳米粒包封率、载药量

根据下表所示不同初始 TGC 浓度所得包封率及载药量的结果, 选择 2mg/mL 作为 TGC 的初始浓度, 包封率为 (67.92±0.37)%, 载药量为 (59.35±0.30)% (表 1)。

表 1 不同 TGC 初始浓度的 TGC/CS 纳米粒包封率及载药量

TGC 初始浓度(mg/ml)	包封率 (%)	载药率 (%)
0.5	21.58±1.31	11.34±1.04
1.0	52.28±0.58	38.57±0.35
1.5	64.98±0.51	53.91±0.42
2.0	67.92±0.37	59.35±0.30
2.5	64.22±0.31	54.18±0.17
3.0	64.96±0.27	49.45±0.41

### 3.2 TGC/CS 纳米粒表征分析

透射电镜结果如图所示, 2mg/ml 的 TGC/CS 纳米粒外观为光滑球形结构, 纳米粒间未见黏连, 粒径大小分布均匀, 粒径为 (224.84±29.38) nm (图 1)。

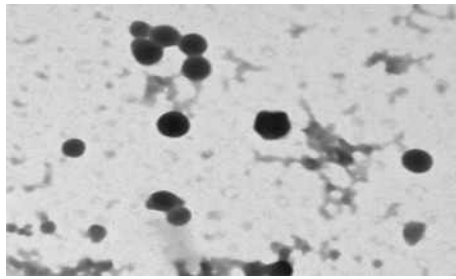


图1 电镜下TGC/CS纳米粒

### 3.3 TGC/CS 纳米粒体外释药

TGC/CS 纳米粒于体外释放时存在突释现象,即在前 18h 累积释放达约 70%,后为缓释,至 48h 时释放量达 98%以上(图 2)。

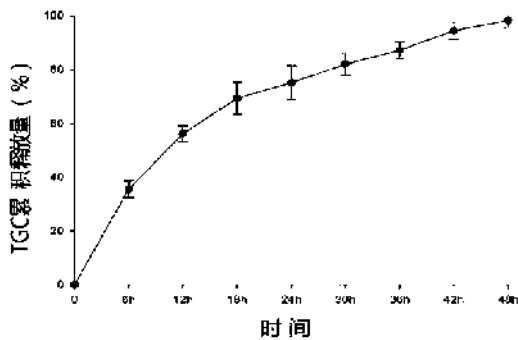


图2 体外 TGC 累积释放量

### 3.4 眼表毒性大体观

使用裂隙灯显微镜对比观察左右眼情况,双眼未见明显异常,且各时间点观察均未见角膜混浊、虹膜出现异常、结膜充血与水肿、巩膜异常或者分泌物增多等情况, Draize 评分为 0。

### 3.5 HE 染色

HE 染色显示实验眼相对对照眼的角膜、结膜未见明显改变。角、结膜上皮细胞完整且紧密连接,各层次染色的结构清晰,未见水肿的发生及炎细胞的浸润(图 3)。

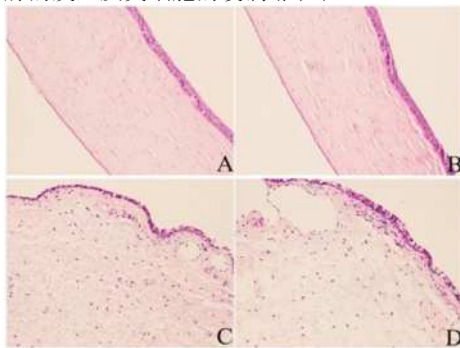


图3 兔实验眼与对照眼角膜、结膜组织病理学观察(200×)

A 为实验组角膜、B 为对照组角膜、C 为实验组结膜、D 为对照组结膜

### 3.6 TUNEL 染色

TUNEL 染色显示实验组的角膜与结膜的凋亡情况与对照组角、结膜基本相同。

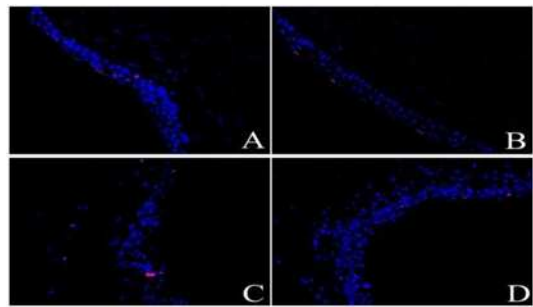


图4 兔实验眼与对照眼角膜、结膜组织 TUNEL 染色观察(400×)

A 为实验组角膜、B 为对照组角膜、C 为实验组结膜、D 为对照组结膜

## 4 讨论

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<sup>[3]</sup>。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<sup>[4]</sup>。例如,四环素家族中的米诺环素被发现除了可以抑制眼部的炎症反应,在抑制小鼠干眼症方面也有一定的治疗作用,且其可抑制新生血管生成<sup>[5]</sup>、在慢性高眼压的作用下保护视网膜免于损伤<sup>[6]</sup>,且对视神经也有一定的保护作用<sup>[7]</sup>。多西环素可以通过抑制 IL-1 和 TNF- $\alpha$  从而抑制碱烧伤角膜的炎症反应<sup>[8]</sup>,也可在一定程度上抑制之后的角膜新生血管生成<sup>[9]</sup>。且其在睑板腺功能障碍及干眼症的治疗上也有所裨益<sup>[10]</sup>。替加环素是四环素家族中较新较强效的一种制剂, Sertan Goktas 等<sup>[11]</sup> 首次探讨了替加环素抑制角膜新生血管的疗效,发现局部应用替加环素后,角膜新生血管明显减少。四环素在眼部疾病治疗中的应用已得到广泛的认可,而替加环素作为四环素家族中的较新的成员,相信其在对眼部疾病的作用大有潜力。

壳聚糖是甲壳素脱 N-乙酰基的产生的一种多糖,由于脱乙酰的程度及方法不同,壳聚糖的相对分子量分布广泛<sup>[12]</sup>。甲壳素是一种纤维素状生物聚合物,主要存在于海洋无脊椎动物和节肢动物的骨骼中,也存在于真菌和酵母中。甲壳素于 1811 年由法国学者 Henri Braconno 的发现,是第一个比纤维素早 30 年被描述的多糖<sup>[13]</sup>。壳聚糖及其衍生物因其丰富的材料供给、良好的生物相容性、可溶性和增强分子在上皮层间的渗透性等性能,引起了人们对其在药物传递方面的兴趣。

纳米材料自上世纪 90 年代应用至今,已然于医药领域受到了广泛的关注。其中纳米粒的优势有:增强药物的穿透性以便穿过血-房水屏障和角膜、增加药物与眼表的接触的时间、实现药物的靶向治疗、延缓药物降解和代谢以增强药物的稳定性以及维持药物的缓慢释放达几个星期甚至几个月。且纳米粒的毒性和副作用低,保质期长,且不需要调整也不需要后期手术移除,是适用于眼科局部给药的新剂型<sup>[14-15]</sup>。且纳米粒具有独特的能力,可以根据其需求进行修饰,以满足特定的需要<sup>[16]</sup>。

壳聚糖纳米粒除了具有一般纳米给药系统的特性,如靶向运输、药物缓释、载药量大、不良反应少和可降解外,还具有其他载体不具备的如抑菌、止血、抗纤维化、辅助免疫、抗肿瘤和促进伤口愈合等优势。目前的研究已展现出其在治疗眼科疾病中的前景,广泛应用于眼科疾病,如青光眼、眼部感染及炎症、眼底疾病<sup>[17]</sup>等。

本实验制备负载替加环素的壳聚糖纳米粒用以眼局部应用,旨在同时发挥替加环素对眼部的治疗作用与纳米粒的缓释、载药、运输和其本身对眼部的治疗效果。且通过后期的检查证明其缓释作用及其对眼表安全无刺激性,是以替加环素/壳聚糖纳米粒可以成为一种治疗眼部疾病的潜在用药。

## 参考文献

- [1]Lakhani P , Patil A , Majumdar S . Recent advances in topical nano drug-delivery systems for the anterior segment[J]. Therapeutic Delivery, 2018, 9(2):137-153.
- [2]邹俊东,刘定坤,杨楠,王谜,刘志辉.生物活性玻璃/壳聚糖复合材料在生物医学领域的应用[J].国际口腔医学杂志,2020,47(01):90-94.
- [3]Goktas S , Kurtoglu M G , Sakarya Y , et al. New Therapy Option for Treatment of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Keratitis: Tigecycline[J]. Journal of Ocular Pharmacology & Therapeutics the Official Journal of the Association for Ocular Pharmacology & Therapeutics, 2015, 31(2):122.
- [4]肖启国,周静,周芳,等.米诺环素滴眼液对小鼠干眼的疗效及机制研究[J].中国现代医学杂志,2015,25(25):1-7.
- [5]张雷,李康,武斌.米诺环素对大鼠角膜碱烧伤炎症反应调控的机制研究[J].临床和实验医学杂志,2019,18(21):2256-2259.
- [6]闫喆一,成霄黎.米诺环素对兔慢性高眼压视网膜组织损伤的保护作用[J].中国实用眼科杂志,2011,29(3):278-280.
- [7]黄晓瑛.米诺环素对大鼠视神经损伤视网膜神经节细胞和小胶质细胞表达的影响[D].河北:医科大学,2013.
- [8]付馨余,邹文进,黄明汉,et al.多西环素对碱烧伤大鼠角膜组织中 NF- $\kappa$ B 和 bc-12 表达的影响[J].眼科新进展,2013(4):312-315.
- [9]邹文进,刘祖国,黄海,魏茜敏.多西环素抑制碱烧伤大鼠角膜新生血管形成[J].广西医学,2015,37(02):137-139.
- [10]张真.局部应用多西环素对苯扎氯铵诱导的小鼠干眼的治疗作用及干眼模型的稳定性研究[D].福建:厦门大学,2014.
- [11]Sertan G , Ender E , Rabia S , et al. Inhibition of Corneal Neovascularization by Topical and Subconjunctival Tigecycline[J]. Journal of Ophthalmology, 2014, 20(14):1-6.
- [12]刘海燕,胡阳,武秀萍,潘浩波,荆璇.壳聚糖基多糖材料防治口腔疾病的作用[J].中国组织工程研究,2020,24(4):631-636.
- [13] Muzzarelli R A A , Boudrant J , Meyer D , et al. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(2):995-1012.
- [14]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.
- [15]Janagam D R , Wu L , Lowe T L. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2017(16):94.
- [16] Halasz K , Pathak Y V . Surface Modification of Nanoparticles for Ocular Drug Delivery[M]. Surface Modification of Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. 2019.
- [17]Tahara K , Karasawa K , Onodera R , et al. Feasibility of drug delivery to the eye's posterior segment by topical instillation of PLGA nanoparticles[J]. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017(7):10.
- 作者简介:第一作者:马高阳,石河子大学硕士研究生,研究方向:眼表疾病与白内障.通讯作者:高晓唯,毕业于第二军医大学,硕士,主任医师,教授,研究方向:眼表疾病、白内障治疗