

## 多西环素对大鼠角膜碱烧伤后氧化应激损伤的抑制作用

王力之, 邹文进

(广西医科大学第一附属医院, 南宁 530021)

**摘要 目的:**观察多西环素(Doxy)对大鼠角膜碱烧伤后氧化应激损伤的抑制作用。**方法:**选取健康SD大鼠204只,随机分为正常组、模型组、Doxy组,每组68只。正常组大鼠不做任何处理,模型组、Doxy组大鼠建立左眼角膜碱烧伤模型。建模成功后正常组不做任何治疗,Doxy组予5.0 g/L Doxy眼液点眼,模型组予眼液溶媒点眼。分别于碱烧伤后的第3、第7、第14、第21天观察计算角膜炎症指数、新生血管面积和角膜浑浊度评分,角膜取材后行病理切片,苏木精-伊红(HE)染色后观察角膜组织病理变化;利用化学荧光法、硫代巴比妥酸(TBA)法、酶联免疫吸附试验(ELISA)检测角膜组织活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)、8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)的含量。**结果:**碱烧伤后的第3、第7、第14、第21天,Doxy组角膜炎症指数、新生血管面积、角膜浑浊度评分均明显低于模型组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ );碱烧伤后的第3、第7、第14、第21天,Doxy组角膜水肿、炎症细胞浸润程度、新生血管形成数量均明显低于模型组,且胶原纤维排列更为规则。碱烧伤后的第3、第7、第14天,Doxy组ROS、MDA、8-OHdG含量均显著低于模型组,但高于正常组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。碱烧伤后的第21天,Doxy组ROS、MDA、8-OHdG含量均显著低于模型组,其中ROS含量高于正常组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ );Doxy组MDA、8-OHdG含量与正常组相比差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ )。**结论:**Doxy可以有效抑制大鼠角膜碱烧伤后的氧化应激损伤,并可能与抑制角膜炎症反应和新生血管的形成有关。

**关键词** 多西环素;角膜碱烧伤;氧化应激

中图分类号:R77.2 文献标志码:A 文章编号:1005-930X(2025)01-0031-08

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.01.005

### The inhibitory effect of doxycycline on oxidative stress injury after corneal alkali burn in rats

WANG Lizhi, ZOU Wenjin. (The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**Abstract Objective:** To observe the inhibitory effect of doxycycline (Doxy) on oxidative stress injury after corneal alkali burn in rats. **Methods:** A total of 204 healthy SD rats were randomly divided into normal group, model group and Doxy group, with 68 rats in each group. The rats in the normal group received no treatment, and the corneal alkali burn model of the left eye was established in the rats of the model group and the Doxy group. After successful modeling, no treatment was given to the rats in the normal group, the rats in the Doxy group were given 5.0 g/L Doxy eye drops, and those in the model group were given menstruum eye drops. Corneal inflammation index, neovascular area and corneal turbidity score were observed and calculated on day 3, day 7, day 14 and day 21 after alkali burn, respectively. Pathological sections were taken after corneal sampling, and pathological changes of corneal tissue were observed after hematoxylin-eosin (HE) staining. The contents of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) in corneal tissue were detected by chemical fluorescence, thiobarbituric acid (TBA) and enzymolinked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** On day 3, day 7, day 14 and day 21 after alkali burn, corneal inflammation index and neovascular area and

[基金项目] 广西科技计划资助项目(No. 桂科 AB20238003)

[通信作者] 邹文进, E-mail: big-stone168@163.com

[收稿日期] 2024-08-12

corneal turbidity score in the Doxy group were significantly lower than those in the model group, and all the differences were statistically significant (all  $P < 0.05$ ). On day 3, day 7, day 14 and day 21 after alkali burn, the degree of corneal edema, inflammatory cell infiltration and the number of neovasculation in the Doxy group were significantly lower than those in the model group, and the arrangement of collagen fibers was more orderly. On day 3, day 7 and day 14 after alkali burn, the contents of ROS, MDA and 8-OHdG in the Doxy group were significantly lower than those in the model group, but higher than those in the normal group, and the differences were all statistically significant (all  $P < 0.05$ ). On day 21 after alkali burn, the contents of ROS, MDA and 8-OHdG in the Doxy group were significantly lower than those in the model group. Among them, the ROS content was higher than that in the normal group, and all the differences were statistically significant (all  $P < 0.05$ ). There were no significant differences in MDA and 8-OHdG contents between the Doxy group and the normal group (all  $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Doxy can effectively inhibit oxidative stress injury after corneal alkali burn in rats, and may be related to inhibiting corneal inflammation and the formation of neovascularization.

**Keywords** doxycycline; corneal alkali burn; oxidative stress

眼化学性碱烧伤既是眼科较为常见的眼外伤,也是最严重的致盲性眼病之一。既往研究主要认为,其病理生理损伤机制一方面在于碱性物质与组织内的脂肪发生皂化反应,皂化反应使组织变软后碱性物质继续向深部扩散,进而造成眼表及深层组织的溶解、液化与坏死<sup>[1-4]</sup>,另一方面在于免疫炎症的参与进一步加重了眼组织的病理损害<sup>[5]</sup>。然而近年来多项研究发现,碱烧伤所诱发的氧化应激损伤可能贯穿了其整个生理病理损伤过程<sup>[2,6-7]</sup>。例如,氧化应激所产生过量的自由基如活性氧(ROS),可直接导致组织细胞结构的损伤<sup>[2]</sup>。其次,过量ROS所引起的脂质过氧化物的标志性降解产物丙二醛(MDA)及DNA氧化应激损伤的产物8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)也可导致细胞内不溶性代谢产物的不断积累、呼吸链电子传递受阻,进一步加重组织细胞结构的损伤<sup>[8-10]</sup>。由于多西环素(Doxy)化学结构式中含有酚环结构,酚环可与自由基反应生成酚基,酚基化学性质稳定且不活泼,从而发挥其清除体内过量ROS的作用;其次,Doxy可通过保护线粒体及细胞膜电位的改变,阻止氧化应激损伤所造成的细胞凋亡<sup>[11-12]</sup>。因此,Doxy可能具有一定抗氧化应激损伤能力。实验研究已发现,在动物心脏、血管系统疾病模型中,Doxy具有抗氧化应激损伤的能力<sup>[12-13]</sup>。本研究通过建立大鼠角膜碱烧伤疾病模型,观察Doxy对氧化应激损伤过程所产生的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂** Doxy粉剂购自Solarbio公司;BCA(Bicinchoninic Acid)蛋白定量试剂盒购自新赛美生物科技有限公司;苏木精-伊红(HE)染色液购自武汉赛维尔生物科技有限公司;ROS/MDA测定试剂盒购自南京建成科技有限公司;大鼠8-OHdG试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。

**1.1.2 实验动物与分组** 204只健康雄性SPF级SD大鼠均以左眼为实验眼,体重(200±20)g,购自广西医科大学实验动物中心(动物生产许可证号:SCXK桂2020-0003)。建模前所有大鼠均通过裂隙灯显微镜检查排除眼前段疾病。按随机数字表法分为正常组、模型组、Doxy组,每组68只(68眼)大鼠。本实验研究方案已取得广西医科大学实验动物福利与伦理委员会批准(批准号:202209023)。

### 1.2 方法

**1.2.1 碱烧伤大鼠模型的建立** 正常组大鼠不做任何处理,模型组、Doxy组大鼠均建立左眼角膜的碱烧伤模型,碱烧伤模型建立前1d,于眼部滴加左氧氟沙星眼液预防感染。首先使用20 g/L戊巴比妥钠予以腹腔注射对大鼠进行全身麻醉,随后使用盐酸丙美卡因滴眼液滴左眼予以眼表麻醉,将大鼠上下结膜穹隆内多余液体用无菌棉签拭干,移液枪

吸取2  $\mu\text{L}$  1 mol/L NaOH溶液,滴到直径3 mm圆形滤纸上,置于大鼠左眼角膜正中央开始计时,40 s后移去滤纸,立即使用平衡盐溶液彻底冲洗结膜囊70 s。若角膜中央形成一圆形灰白色灼烧区域,大小相同,角膜基质水肿,虹膜隐约可见,表明建模成功<sup>[14-15]</sup>。建模成功后,正常组不予任何治疗,模型组及Doxy组分别予以眼液溶媒、5.0 g/L Doxy滴左眼,模型组所使用眼液溶媒成分与Doxy眼液溶媒成分完全一致,4次/d,20  $\mu\text{L}$ /次,连续滴眼21 d。分别于碱烧伤后的第3、第7、第14、第21天4个时间点每组随机选取17只大鼠,使用20 g/L戊巴比妥钠对大鼠行腹腔注射以诱导全身麻醉,麻醉状态期间使用裂隙灯显微镜,在弥散光及低倍镜下观察大鼠左眼前段情况并行左眼前段照相,计算角膜炎症指数、新生血管面积及角膜浑浊度评分;随后立刻处死每组所选取大鼠,快速行左眼角膜取材后每组随机选取5只大鼠角膜标本行病理切片及HE染色,剩余角膜标本存放于冰箱,在-80  $^{\circ}\text{C}$ 低温环境下保存备用,进一步检测ROS、MDA、8-OHdG含量。整个实验操作过程注意无菌原则,实验期间各组大鼠均不再局部预防感染治疗,去除实验期间发生左眼角膜感染、穿孔或严重前房积血等并发症实验大鼠,并及时补充实验大鼠。

**1.2.2 角膜炎症指数计算** 裂隙灯显微镜下观察大鼠角膜缘血管充血程度、中央角膜和外周角膜水肿程度,参照国际通用评分标准<sup>[16]</sup>,首先分别计算出角膜缘血管、中央及外周角膜3个部位情况分值,再将3个部位评分值总和除以9得出最终数值,大鼠角膜炎症指数即为最终所得数值。

**1.2.3 角膜新生血管面积计算** 裂隙灯显微镜下观察并计算大鼠角膜新生血管长度及面积,公式<sup>[17]</sup>:  $S=C/12\times\pi[r^2-(r-l)^2]$ ,  $C$ 为角膜缘新生血管所占的圆周钟点数值,  $l$ 为角膜新生血管的长度值,  $r$ 为大鼠角膜的半径值。

**1.2.4 角膜浑浊度评分** 裂隙灯显微镜下观察大鼠角膜混浊程度,参照评分标准计算出大鼠角膜浑浊度评分:0分:角膜透明无混浊;1分:角膜轻度混浊,虹膜纹理可见;2分:角膜混浊较重,虹膜纹理不清;3分:角膜混浊进一步加重,但仍可见瞳孔;4分:角膜完全混浊,瞳孔不清<sup>[18]</sup>。

**1.2.5 角膜病理切片** 行大鼠左眼角膜取材后将

角膜组织用4%多聚甲醛液进行固定,固定时间为24 h,利用梯度乙醇予以脱水,石蜡包埋,经大鼠角膜中央切片,切片厚度为5  $\mu\text{m}$ ,予以HE染色,中性树胶封片,使用光镜观察。

**1.2.6 角膜组织中ROS含量测定** 采用酶消化法(胶原酶、胰蛋白酶)消化大鼠角膜后制备大鼠角膜单细胞悬液,使用ROS测定试剂盒利用化学荧光法测定各细胞悬液样本中ROS的荧光度值,同时取部分细胞悬液经超声破碎处理后,利用BCA蛋白定量法检测各细胞悬液样本总蛋白浓度,各细胞悬液样本中ROS荧光度值除以各细胞悬液样本总蛋白浓度值即为单位总蛋白中的ROS的荧光度值。具体步骤参照试剂说明书,其最终结果单位以荧光度值/mg蛋白表示。

**1.2.7 角膜组织中MDA含量测定** 将大鼠角膜组织剪碎后按重量体积比(g/mL)1:19的比例加入预冷PBS,经高速低温组织研磨仪(Servicebio KZ-III-FP)制成5%的组织匀浆,转移至离心管中,低温高速离心机(Eppendorf AG 22331 Hamburg)5 000 r/min 4  $^{\circ}\text{C}$ 离心2 min,收集上清液备用,使用MDA测试盒利用TBA法测定各上清液样本中MDA的含量,同时取部分上清液样本,利用BCA蛋白定量法检测各上清液样本总蛋白浓度(mg/mL),各上清液样本中MDA浓度值除以各上清液样本中总蛋白浓度值即为单位总蛋白中的MDA浓度值。具体步骤参照试剂说明书,其最终结果单位以nmol/mg prot表示。

**1.2.8 角膜组织中8-OHdG含量测定** 将大鼠角膜组织剪碎后按重量体积比(g/mL)1:19的比例加入预冷PBS,经高速低温组织研磨仪(Servicebio KZ-III-FP)制成5%的组织匀浆,转移至离心管中,低温高速离心机(Eppendorf AG 22331 Hamburg)5 000 r/min离心5 min,收集上清液备用,使用大鼠8-OHdG试剂盒,利用ELISA测定各上清液样本中8-OHdG的浓度(ng/mL),同时取部分上清液样本,利用BCA蛋白定量法检测各上清液样本总蛋白浓度(mg/mL),各上清液样本中8-OHdG浓度值除以各上清液样本总蛋白浓度值即为单位总蛋白中的8-OHdG浓度值。具体步骤参照试剂说明书,其最终结果单位以ng/mg prot表示。

**1.2.9 统计学方法** 本次实验研究均行3次重复性观察,所有计量资料使用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,



应用 SPSS 26.0 统计软件进行相关数据处理,使用单因素方差分析进行多组间比较,采用 LSD-*t* 检验行组间两两比较,以  $P<0.05$  差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠各时间点角膜炎症指数及新生血管面积比较

以正常组作为参照,碱烧伤后的第 3、第 7 天模型组、Doxy 组大鼠结膜均呈高度充血状态,角膜呈弥漫性水肿状态且中央碱烧灼区为重,但模型组相较 Doxy 组结膜充血程度与角膜水肿程度更重,第 14、第 21 天,模型组、Doxy 组结膜充血程度及角膜水肿程度均较前逐渐减轻,并均可见角膜中央碱烧灼区血管翳开始逐渐形成,但 Doxy 组相较模型组好转程度更为明显,Doxy 组角膜血管翳形成程度

更轻,角膜透明度也相对更高;以正常组作为参照,碱烧伤后第 3 天,模型组与 Doxy 组大鼠角膜缘处均可见少量角膜新生血管开始形成,模型组从第 7 天开始角膜缘新生血管明显长入角膜,且面积逐步增大,增至第 14 天到达最大面积,第 21 天角膜新生血管面积较前略减小,Doxy 组第 7、第 14 天角膜新生血管面积较第 3 天均有所增加,第 21 天开始角膜新生血管面积较前明显减小,见图 1。3 组大鼠角膜碱烧伤后各时间点角膜炎症指数见表 1,以正常组作为参照,碱烧伤后的第 3、第 7、第 14、第 21 天,Doxy 组角膜炎症指数均显著低于模型组(均  $P<0.05$ )。3 组大鼠角膜碱烧伤后各时间点角膜新生血管面积大小见表 2,以正常组作为参照,碱烧伤后的第 3、第 7、第 14、第 21 天,Doxy 组角膜新生血管面积均显著小于模型组(均  $P<0.05$ )。

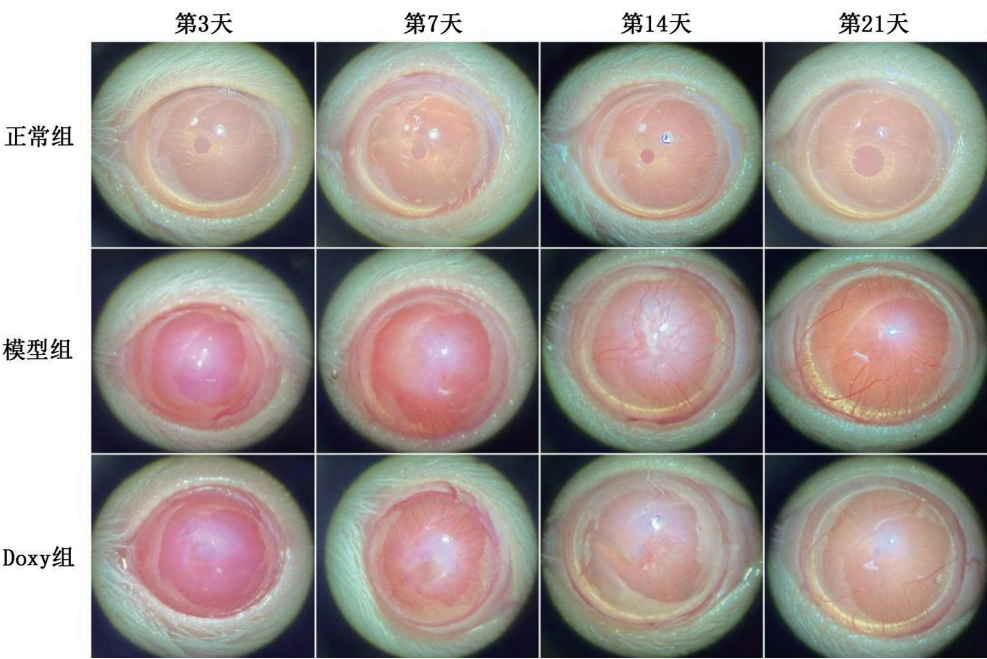


图1 角膜碱烧伤后各组大鼠各时间点角结膜情况

表1 各组大鼠角膜碱烧伤后各时间点角膜炎症指数

组别	$\bar{x} \pm s, n=12$			
	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
正常组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	0.71±0.06*	0.82±0.06*	0.74±0.06*	0.58±0.04*
Doxy 组	0.58±0.04* <sup>△</sup>	0.69±0.11* <sup>△</sup>	0.65±0.08* <sup>△</sup>	0.43±0.11* <sup>△</sup>

与正常组相比,\* $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

表2 各组大鼠角膜碱烧伤后各时间点角膜新生血管面积

组别	$\bar{x} \pm s, \text{mm}, n=12$			
	第3天	第7天	第14天	第21天
正常组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	13.79±2.02*	23.98±1.83*	24.88±4.87*	20.53±0.73*
Doxy组	11.24±1.27* <sup>△</sup>	16.76±1.56* <sup>△</sup>	17.23±2.17* <sup>△</sup>	10.94±2.13* <sup>△</sup>

与正常组相比,\* $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠各时间点角膜组织病理学变化

以正常组作为参照,碱烧伤后的第3天模型组、Doxy组大鼠角膜上皮细胞层及基质层明显水肿,均可见角膜大泡形成,胶原纤维排列紊乱,伴有大量炎症细胞浸润,角膜新生血管壁逐渐形成,但模型组相较Doxy组角膜组织各层水肿程度与炎症细胞浸润程度更重;第7、第14天模型组、Doxy组角膜水肿程度及炎症细胞浸润程度均较前逐渐减轻,胶原纤维

排列较前逐渐规则,角膜新生血管腔形成数量较前增多,但Doxy组相较模型组好转程度更为明显;第21天Doxy组角膜水肿程度及炎症细胞浸润程度均较前明显减轻,胶原纤维排列较前逐渐规则,角膜新生血管腔数量较前减少,但模型组角膜组织仍可见较为明显的炎性细胞浸润、角膜新生血管腔形成,同时还可见角膜基质层瘢痕组织的形成,见图2。

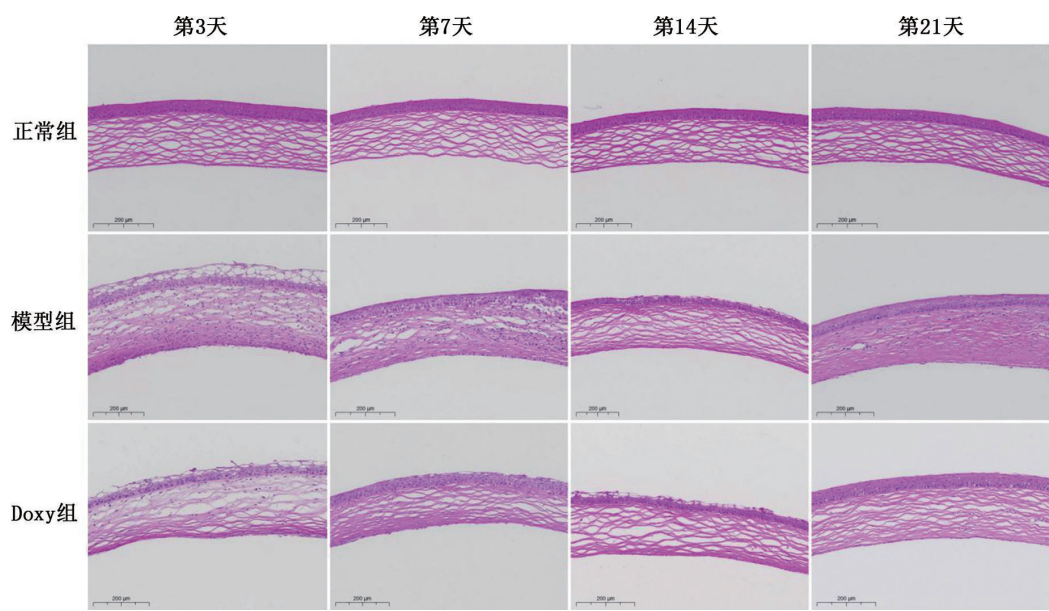


图2 角膜碱烧伤后各组大鼠各时间点角膜组织病理切片HE染色图(×200)

2.3 各组大鼠各时间点角膜浑浊度评分比较

角膜碱烧伤后,以正常组作为参照,模型组、Doxy组角膜浑浊度评分第3天起逐步升高,升至第7天到达最大值,第7天以后开始逐步下降。角膜碱烧伤后的第3、第7、第14、第21天,模型组、Doxy组与正常组相比角膜浑浊度评分均明显增高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ );角膜碱烧伤后第3、第7、第14、第21天,Doxy组角膜浑浊度评分低于模型组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ ),见表3。

2.4 各组大鼠各时间点角膜组织中ROS含量比较

角膜碱烧伤后,以正常组作为参照,模型组、

Doxy组角膜组织中ROS含量第3天起即可见逐步升高,升至第14天到达最高峰,第14天以后开始逐步下降。角膜碱烧伤后的第3、第7、第14、第21天,模型组、Doxy组与正常组相比,ROS含量均明显增加,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ );角膜碱烧伤后的第3、第7、第14、第21天,Doxy组ROS含量均低于模型组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ ),见表4。

2.5 各组大鼠各时间点角膜组织中MDA含量比较

角膜碱烧伤后,以正常组作为参照,模型组、

Doxy组角膜组织中MDA含量第3天起即可见逐步升高,升至第14天到达最高峰,第14天以后开始逐步下降。角膜碱烧伤后的第3、第7、第14天,模型组、Doxy组与正常组相比MDA含量均明显增加,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ );角膜碱烧伤后第3、第7、第14、第21天,Doxy组MDA含量低于模型组,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$ );角膜碱烧伤后的第21天,模型组MDA含量高于正常组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );角膜碱烧伤后的第21天,Doxy组MDA含量与正常组相比,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表5。

2.6 各组大鼠各时间点角膜组织中8-OHdG含量

比较

角膜碱烧伤后,以正常组作为参照,模型组、Doxy组角膜组织中8-OHdG含量第3天起即可见升高并达到峰值,第7、第14、第21天依次逐步下降。角膜碱烧伤后的第3、第7、第14天,模型组、Doxy组与正常组相比8-OHdG含量均显著增加(均 $P<0.05$ );角膜碱烧伤后第3、第7、第14、第21天,Doxy组8-OHdG含量低于模型组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ );角膜碱烧伤后第21天,模型组8-OHdG含量高于正常组(均 $P<0.05$ );角膜碱烧伤后第21天,Doxy组8-OHdG含量与正常组相比,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表6。

表3 各组大鼠角膜碱烧伤后各时间点角膜浑浊度评分

$\bar{x} \pm s$ ,分, $n=12$				
组别	第3天	第7天	第14天	第21天
正常组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	3.50±0.52 <sup>*</sup>	3.83±0.39 <sup>*</sup>	3.17±0.39 <sup>*</sup>	2.83±0.39 <sup>*</sup>
多西环素组	2.92±0.29 <sup>*△</sup>	3.17±0.58 <sup>*△</sup>	2.75±0.45 <sup>*△</sup>	2.00±0.60 <sup>*△</sup>

与正常组相比<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

表4 各组大鼠角膜碱烧伤后各时间点角膜ROS含量

$\bar{x} \pm s$ ,荧光度值/mg, $n=12$				
组别	第3天	第7天	第14天	第21天
正常组	22 823.41±2 237.49	22 823.41±2 237.49	22 823.41±2 237.49	22 823.41±2 237.49
模型组	33 093.44±2 373.86 <sup>*</sup>	46 489.39±4 555.53 <sup>*</sup>	75 297.94±5 891.85 <sup>*</sup>	64 566.75±14 516.50 <sup>*</sup>
Doxy组	27 312.13±2 145.41 <sup>*△</sup>	33 854.36±4 060.23 <sup>*△</sup>	57 874.37±9 371.98 <sup>*△</sup>	41 609.10±741.16 <sup>*△</sup>

与正常组相比,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

表5 各组大鼠角膜碱烧伤后各时间点角膜MDA含量

$\bar{x} \pm s$ ,nmol/mg prot, $n=12$				
组别	第3天	第7天	第14天	第21天
正常组	0.50±0.08	0.50±0.08	0.50±0.08	0.50±0.08
模型组	0.94±0.03 <sup>*</sup>	0.96±0.09 <sup>*</sup>	1.19±0.28 <sup>*</sup>	0.71±0.11 <sup>*</sup>
Doxy组	0.71±0.08 <sup>*△</sup>	0.73±0.08 <sup>*△</sup>	0.78±0.11 <sup>*△</sup>	0.49±0.08 <sup>△</sup>

与正常组相比,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

表6 各组大鼠角膜碱烧伤后各时间点角膜8-OHdG含量

$\bar{x} \pm s$ ,ng/mg prot, $n=12$				
组别	第3天	第7天	第14天	第21天
正常组	1.73±0.27	1.73±0.27	1.73±0.27	1.73±0.27
模型组	4.16±0.26 <sup>*</sup>	3.31±0.58 <sup>*</sup>	3.21±0.46 <sup>*</sup>	2.61±0.24 <sup>*</sup>
Doxy组	3.12±0.41 <sup>*△</sup>	2.56±0.40 <sup>*△</sup>	2.32±0.03 <sup>*△</sup>	2.09±0.15 <sup>△</sup>

与正常组相比,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

3 讨论

碱化学损伤可以直接通过破坏细胞和细胞外基质,也可以间接通过启动非时间限制的炎症过程共同产生组织损伤效应<sup>[19]</sup>。既往研究热点常集中于角膜碱烧伤后角膜上皮细胞、角膜基质细胞和免疫



细胞之间在细胞因子介导下相互作用,进而引起角膜新生血管、纤维化和严重的炎症反应<sup>[4]</sup>。如今随着对角膜碱烧伤病理生理损伤机制的更深入认识,角膜碱烧伤后随之而来的氧化应激损伤逐渐受到专家学者关注。现有研究认为,碱性损伤物一方面可使组织细胞内 ROS 的生成增多,另一方面通过烷基化反应的发生共同导致细胞受损<sup>[2]</sup>。ROS 是组织细胞进行有氧呼吸时生成的一系列代谢产物,包括有羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )、超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )、烷氧基( $\text{RO}\cdot$ )等,其化学性质活泼,氧化活性较高<sup>[20]</sup>。在生理情况下,机体可通过自身抗氧化体系使体内 ROS 保持在相对稳定的适量水平,适量水平的 ROS 可参与组织细胞多种生理过程,是维持机体内环境稳态的必要条件,但当机体抗氧化能力减弱时,可导致机体内 ROS 过量积聚,影响机体的内环境稳态。近年来有研究发现,碱烧伤产生过量的 ROS 可通过对脂质、蛋白质和核酸的损伤致使正常组织细胞受损<sup>[8]</sup>。其中,MDA 作为脂质过氧化物的标志性降解产物,具有较强的细胞毒性,可与核酸、磷脂蛋白等胞内大分子物质形成不溶性代谢产物,由于不溶性代谢产物化学结构相对稳定,可在细胞内不断聚积,从而影响细胞的正常功能<sup>[9]</sup>。8-OHdG 是 ROS 攻击细胞线粒体 DNA 后产生的,可通过修饰尿苷酸影响碱基及嘌呤的结构稳定性,引发 DNA 双链断裂,阻碍细胞增殖,促进细胞凋亡的发生<sup>[10,21]</sup>。另外,8-OHdG 可使细胞线粒体呼吸链中电子传递过程遭受严重破坏,进而使 ROS 生成增多,由此恶性循环产生更多 8-OHdG<sup>[10]</sup>。因此,机体内的 8-OHdG 的水平可以用于反映组织细胞 DNA 氧化应激损伤的程度<sup>[22]</sup>。

Doxy 为四环素类抗生素,虽本身具有抑菌活性,临床上常用于治疗许多革兰阳性、阴性菌感染,但在部分眼科疾病,例如睑板腺功能障碍、干眼症、角膜溃疡中的应用,主要利用其除抗菌作用以外的抗炎及金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)抑制特性。此外,研究已发现在眼化学性碱烧伤模型中,Doxy 可减轻前期角膜的溶解坏死以及后期瘢痕组织的形成;Liu 等<sup>[23]</sup>实验研究发现,将 Doxy 通过羟丙基壳聚糖微球(HCM)包裹在胶原膜(Col)中形成载药胶原蛋白膜 Doxy-HCM/Col,在碱

烧伤兔眼表移植 Doxy-HCM/Col,能有效抑制 MMP-9 和 MMP-13 的表达,促进角膜早期再上皮化,加速碱烧伤角膜的重建。Yi 等<sup>[24]</sup>实验研究发现,在大鼠角膜碱烧伤模型中,Doxy 可通过降低大鼠角膜组织中 TGF- $\beta$ 1 的表达量及活性,进一步抑制角膜上皮细胞和巨噬细胞中 MMP-9 的表达,同时抑制角膜成纤维细胞转化为肌成纤维细胞,最终减轻角膜组织的溶解和疤痕的形成。周佳欣等<sup>[25]</sup>实验研究发现,在大鼠角膜碱烧伤模型中,应用 Doxy 滴眼液治疗可促进大鼠角膜的愈合,减轻角膜瘢痕的形成,其机制可能与抑制纤连蛋白异常增殖、I 型胶原蛋白异常沉积有关。本研究中,通过建立大鼠的角膜碱烧伤模型,使用 Doxy 连续滴眼 21 d,第 3、第 7、第 14、第 21 天碱烧伤角膜组织水肿、炎症细胞浸润程度、新生血管形成数量、角膜浑浊度评分、ROS、MDA、8-OHdG 含量均低于模型组;此外,伴随 ROS、MDA、8-OHdG 含量降低,Doxy 组各时间点角膜炎症指数及角膜新生血管面积均显著小于模型组。由此推测,Doxy 对大鼠角膜碱烧伤后的氧化应激损伤有抑制作用。并且 Doxy 可减轻角膜炎症程度及新生血管的形成,其机制可能与抑制 ROS、MDA、8-OHdG 生成有关。

综上所述,Doxy 可通过抑制碱烧伤角膜组织中 ROS、MDA、8-OHdG 的水平,从而产生角膜氧化应激损伤抑制效应,同时也可降低角膜碱烧伤后的炎症程度及减少角膜新生血管的形成,这可能是 Doxy 促进角膜碱烧伤修复作用机制之一。

## 参考文献:

- [1] 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.
- [2] CEJKA C, CEJKOVA J. Oxidative stress to the cornea, changes in corneal optical properties, and advances in treatment of corneal oxidative injuries[J]. Oxidative medicine and cellular longevity, 2015, 2015(1): 591530.
- [3] YU Y, ZHOU X Z, YE L, et al. Rhamnazin attenuates inflammation and inhibits alkali burn-induced corneal neovascularization in rats[J]. RSC advances, 2018, 8(47): 26696-26706.
- [4] 李建德.小鼠角膜碱烧伤及雷帕霉素对其修复的机制研究[D].兰州:兰州大学,2021.

- [5] KRAWCZYK P, AMBROZIAK A M, SZAFLIK J P. Molecular aspects of corneal neovascularization[J]. *Klinika oczna*, 2014, 116(3): 210-214.
- [6] ZHOU A Y, BAI Y J, ZHAO M, et al. KH90, a recombinant human VEGF receptor fusion protein, reduced the level of placental growth factor in alkali burn induced corneal neovascularization[J]. *Ophthalmic research*, 2013, 50(3): 180-186.
- [7] 夏清平, 常琳, 莫艳菲, 等. 薄荷醇提高臭氧治疗大鼠角膜碱烧伤的实验研究[J]. *中国药物应用与监测*, 2020, 17(3): 148-151.
- [8] KHOSHDEL A R, EMAMI ALEAGHA O, SHAHRIARY A, et al. Topical effects of N-acetyl cysteine and doxycycline on inflammatory and angiogenic factors in the rat model of alkali-burned cornea[J]. *Journal of interferon & cytokine research*, 2023, 42(2): 82-89.
- [9] 孙红双, 尹丹, 刘颖, 等. 老年性白内障患者血清及房水中SOD、MDA表达与后囊膜混浊的关系[J]. *眼科新进展*, 2020, 43(6): 476-479.
- [10] 樊维, 谢琳. 8-OHdG在糖尿病视网膜病变中的研究进展[J]. *眼科新进展*, 2016, 36(8): 780-783.
- [11] ELEWA M A F, AL-GAYYAR M M, SCHAAALAN M F, et al. Hepatoprotective and anti-tumor effects of targeting MMP-9 in hepatocellular carcinoma and its relation to vascular invasion markers[J]. *Clinical & experimental metastasis*, 2015, 32(5): 479-493.
- [12] RIBA A, DERES L, EROS K, et al. Doxycycline protects against ROS-induced mitochondrial fragmentation and ISO-induced heart failure[J]. *PLoS one*, 2017, 12(4): e0175195.
- [13] ANTONIO R C, CERON C S, RIZZI E, et al. Antioxidant effect of doxycycline decreases MMP activity and blood pressure in SHR[J]. *Molecular and cellular biochemistry*, 2014, 386(1/2): 99-105.
- [14] LI J D, DU S B, SHI Y P, et al. Rapamycin ameliorates corneal injury after alkali burn through methylation modification in mouse TSC1 and mTOR genes[J]. *Experimental eye research*, 2021, 203: 108399.
- [15] BIAN F, PELEGRINO F S A, HENRIKSSON J T, et al. Differential effects of dexamethasone and doxycycline on inflammation and MMP production in murine alkali-burned corneas associated with dry eye[J]. *The ocular surface*, 2016, 14(2): 242-254.
- [16] 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.
- [17] 程新潮, 曹瑾, 杨洁, 等. LncRNA NEAT1调控miR-505-3p/VEGFA对碱烧伤大鼠角膜新生血管的影响[J]. *眼科新进展*, 2023, 43(11): 863-868.
- [18] 蒋波, 田莎, 李涛, 等. 石斛酚抑制碱烧伤大鼠角膜新生血管的实验研究[J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(7): 846-855.
- [19] 李莹, 译. 角膜理论基础与临床实践[M]. 4版. 天津: 天津科技翻译出版社, 2007: 771-785.
- [20] 王力之, 邹文进, 何冰冰, 等. 多西环素对角膜碱烧伤修复作用机制的研究进展[J]. *广西医科大学学报*, 2023, 40(11): 1928-1932.
- [21] 张旭铭, 刘静, 潘志尧, 等. 缺氧缺血性脑病患儿血清8-OHdG、VILIP-1和NSE水平变化及其与NBNA评分的相关性分析[J]. *广西医科大学学报*, 2019, 36(11): 1779-1782.
- [22] 林学贤, 张亚和, 崔光锐. 血清8-OHdG、T-cad与急性胰腺炎患者病情严重程度、疾病转归的关系[J]. *中南医学科学杂志*, 2024, 52(4): 592-595.
- [23] LIU J, XU Y N, HUANG Y R, et al. Collagen membrane loaded with doxycycline through hydroxypropyl chitosan microspheres for the early reconstruction of alkali-burned cornea[J]. *International journal of biological macromolecules*, 2023, 244(31): 125188.
- [24] YI Q, ZOU W J. The wound healing effect of doxycycline after corneal alkali burn in rats[J]. *Journal of ophthalmology*, 2019(10): 516862.
- [25] 周佳欣, 邹文进. 多西环素对角膜瘢痕形成的影响[J]. *广西医科大学学报*, 2022, 39(4): 606-611.

本文引用格式:

王力之, 邹文进. 多西环素对大鼠角膜碱烧伤后氧化应激损伤的抑制作用[J]. *广西医科大学学报*, 2025, 42(1): 31-38. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.01.005

WANG L Z, ZOU W J. The inhibitory effect of doxycycline on oxidative stress injury after corneal alkali burn in rats [J]. *Journal of Guangxi medical university*, 2025, 42(1): 31-38. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.01.005