

# 局部应用两性霉素 B 脂质体滴眼治疗兔曲霉菌性角膜溃疡的效果

王亮<sup>1</sup>, 张林<sup>2</sup>, 吴洁<sup>1</sup>, 刘先宁<sup>1</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(710002)中国陕西省西安市,陕西省眼科研究所;  
<sup>2</sup>(710061)中国陕西省西安市,西安交通大学第一附属医院眼科  
作者简介:王亮,女,硕士,主治医师,研究方向:角膜病。  
通讯作者:张林,副教授,副主任医师,研究方向:角膜病. meng-  
topwang@163. com  
收稿日期:2009-12-21 修回日期:2010-03-01

## Study on topical application of amphotericin B liposome in the treatment of keratomycosis in a rabbit model

Liang Wang<sup>1</sup>, Lin Zhang<sup>2</sup>, Jie Wu<sup>1</sup>, Xian-Ning Liu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Eye Research Institute of Shaanxi, Xi'an Eye Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

**Correspondence to:** Lin Zhang. Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. mengtopwang@163. com

Received: 2009-12-21 Accepted: 2010-03-01

### Abstract

• **AIM:** To evaluate the efficacy of topical amphotericin B liposome (AmBL) injection in the management of keratomycosis in a rabbit model.

• **METHODS:** Forty New Zealand White rabbits model of aspergillus keratitis were randomized into four groups (groups A, B, C and D), with 10 eyes in each group. Group A were treated with 5g/L AmBL, group B 2.5g/L AmBL, group C were treated with 5g/L amphotericin B eye drop (AmBS), group D were treated with normal saline as the control group. After 3 days, treatments were performed every 15 minutes, totally for 4 times, then it changed to six times per day. Eye examinations were performed after 3, 5, 7, 10, 15 days. Quantitation of fungi in the cornea was achieved by culturing homogenates and counting colony-forming units.

• **RESULTS:** Corneal edema, corneal infiltration range, hypopyon, and conjunctival hyperemia revealed that after 7, 10 days treatment, group A, B was significantly different compared to the other groups ( $P < 0.01$ ), but not at day 3, 5. Corneal new vessels in groups A, B were significantly different compared to groups C, D after 7 days treatment but not different after 10, 15 days. Quantitative cultures in groups A, B were significantly different compared to groups C, D after 7, 10 days treatment.

• **CONCLUSION:** Intracameral AmBL injection can effectively inhibit the progress of keratomycosis. 2.5g/L AmBL and 5g/L AmBL are not significantly different in therapeutic effect.

• **KEYWORDS:** aspergillus; corneal ulcer; amphotericin B; liposome

Wang L, Zhang L, Wu J, et al. Study on topical application of amphotericin B liposome in the treatment of keratomycosis in a rabbit model. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(4):639-642

### 摘要

**目的:**探讨两性霉素 B 脂质体 (AmBL) 对兔实验性曲霉菌性角膜溃疡的治疗作用。

**方法:**用 40 只新西兰白兔,采用角膜“#”形划痕法制作实验性曲霉菌性角膜溃疡模型,随机分为 4 组,每组 10 眼。A 组应用 5g/L AmBL 滴眼液点眼, B 组应用 2.5g/L AmBL 滴眼液点眼, C 组应用 5g/L 两性霉素 B 滴眼液 (AmBS) 点眼, D 组应用生理盐水点眼作对照。造模后第 3d 每 15min 点眼 1 次,共点眼 4 次,后改为每天点眼 6 次,并于造模后 3, 5, 7, 10, 15d, 用裂隙灯显微镜观察结膜充血, 角膜水肿, 角膜浸润的范围, 角膜新生血管, 房水闪辉, 前方积脓的水平作为得分, 并进行角膜刮片, 角膜共焦纤维镜, 角膜组织病理切片及培养观察真菌的生长程度。

**结果:**A, B 组造模后 3, 5d 角膜水肿, 角膜浸润范围, 前房积脓, 结膜充血均与其它组无明显差别, 造模后 7, 10d, 较其它组显著减轻, 造模后 15d, 各组间无明显差异。A 组, B 组, 与 C 组, D 组在造模后 7d 角膜新生血管存在明显差异, 造模后 10d, 15d 无明显差异。4 组间在造模后 7, 10d 角膜刮片及角膜病理学检查存在明显差异, 造模后 15d 无明显差异。

**结论:**AmBL 眼液能有效抑制曲霉菌性角膜溃疡的进展, 5g/L AmBL 及 2.5g/L AmBL 均有良好的耐受性, 治疗效果无显著差异。

**关键词:**曲霉菌; 角膜溃疡; 两性霉素 B; 脂质体

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.04.009

王亮, 张林, 吴洁, 等. 局部应用两性霉素 B 脂质体滴眼治疗兔曲霉菌性角膜溃疡的效果. 国际眼科杂志 2010;10(4):639-642

### 0 引言

真菌性角膜溃疡和真菌性眼内炎作为高致盲性眼病由于发病率有逐年增长的趋势, 近年来越来越受到重视。其临床表现呈复杂多样性, 临床诊断困难, 确诊常需要病原学检查, 如组织刮片检查、真菌培养等。而许多抗真菌药物由于穿透性差、局部刺激性和毒性大, 易产生耐药性等, 使应用受到限制。两性霉素 B 是一种古老的抗

真菌药物,由于副作用大而较少使用,但其新剂型即两性霉素B脂质体由于增强了组织穿透性、降低了副作用,真菌抗药性低<sup>[1]</sup>,在真菌性角膜溃疡的治疗中越来越受到重视。我们探讨两性霉素B脂质体对免疫曲霉菌性角膜溃疡的治疗作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 两性霉素B脂质体滴眼液采用两性霉素B脂质体(上海新先锋药业有限公司生产)粉剂,使用灭菌注射用水配制成5g/L及2.5g/L溶液,避光4℃保存。两性霉素B眼液采用两性霉素B(华北制药集团生产)粉剂,使用灭菌注射用水配制成5g/L溶液,避光4℃保存。曲霉菌菌株由陕西省眼科研究所提供。标准菌株接种于沙保氏培养基,置37℃培养。真菌悬液制备:培养标准菌株3~5d,见菌落形成后,在无菌条件下用接种环取少许菌落,置于无菌注射用水中,充分振荡混匀,于红细胞计数板上计数孢子数量,并调整菌悬液密度至 $10^6$ cfu/L备用。

**1.2 方法** 角膜溃疡模型制作:新西兰白兔40只,在无菌条件下刮去兔角膜上皮做为植床,将内皮面作“#”形划痕的保存兔角膜植片,用10-0尼龙缝线放射性缝合在受体角膜上,将曲霉菌混悬液0.1mL注入植片与植床间,缝合上下眼睑,建立模型。3d后拆除眼睑缝线,去除角膜植片,观察角膜情况。按随机数字表法分4组,每组10兔10眼。造模后3d开始点眼。A组应用5g/L AmBL点眼,B组应用2.5g/L AmBL点眼,C组应用5g/L AmBS点眼,D组生理盐水点眼作为对照。造模后3d每15min点眼1次,共点眼4次,后改为6次/d。造模后3,5,7,10,15d,用裂隙灯显微镜观察结膜充血,角膜水肿,角膜浸润的范围,角膜新生血管,房水闪辉,前房积脓的水平作为得分,并进行角膜刮片,角膜共焦显微镜检查,角膜组织病理切片及培养观察真菌的生长程度<sup>[2]</sup>。结膜充血的等级为:0级:无充血;1级:少量充血;2级:中度充血;3级:重度充血。角膜水肿的分级:0级:角膜清亮;1级:局部水肿;2级:大于两个象限的角膜水肿;3级:全角膜水肿。角膜新生血管的分级:0级:无新生血管;1级:新生血管距角膜缘 $\leq 2$ mm;2级:新生血管距角膜缘 $> 2$ mm但未到角膜中央;3级:新生血管到达角膜中央。房水闪辉参照 Sander 标准:0级:无(光束透明);1级:轻度(微弱发白光束);2级:中度(中度乳白光束,可辨别虹膜和晶状体细节);3级:显著(明显乳白光束,难以辨别虹膜和晶状体细节);4级:严重(房水成凝固状态,伴大量纤维素性渗出物)。临床得分为上述分值相加,以均数 $\pm$ 标准差表示。角膜刮片检查:造模后5,7,10,15d进行角膜刮片,3.9mol/L氢氧化钾湿片法检查,并进行角膜共焦显微镜检查。每组随机选取1兔,采用耳缘静脉注射空气法处死,取病变角膜制作病理切片45张,厚6 $\mu$ m,随机抽签法选取16张,分别行苏木素2伊红(HE)及过碘酸雪夫(PAS)染色各8张。

## 2 结果

**2.1 裂隙灯显微镜检查** 接种真菌的40只兔眼均一次接种成功,在接种后3d可观察到浅层角膜真菌病变。结膜囊有黄白色分泌物,结膜充血,病变角膜与健康角膜边界清晰,角膜表面粗糙,轻度隆起,基质混浊水肿,部分出现前房积脓(图1A),虹膜无新生血管。3d开始点眼。7d A和B组结膜充血、角膜水肿较5d明显减轻,角膜新生血管较5d增多,但两组之间无明显差异;C组比A,B组结膜充血、角膜水肿症状严重,角膜新生血管较少,部分可见前房积脓;D组可见明显溃疡灶并有苔垢样坏死组织附着,

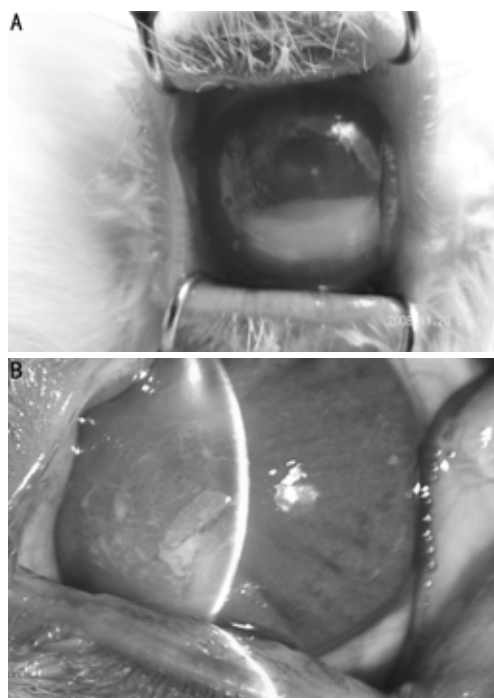


图1 眼裂隙灯显微镜检查 A:曲霉菌接种3d;B:曲霉菌接种7d。

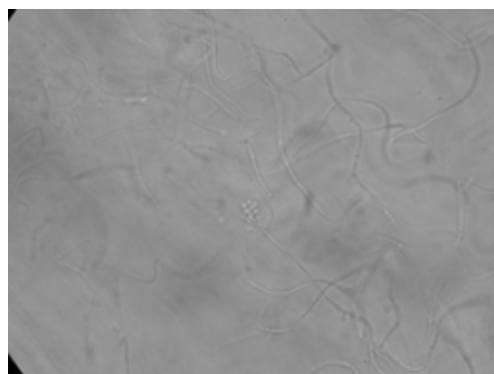


图2 氢氧化钾湿片检查。

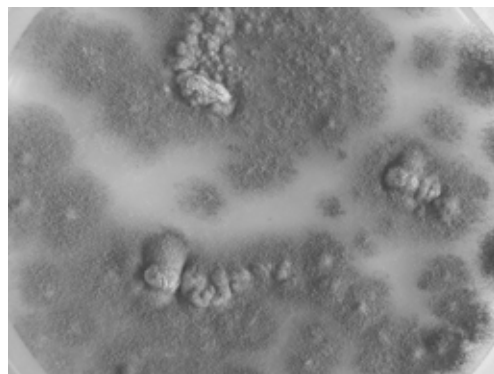


图3 曲霉菌 Sabouraud 培养基培养。

溃疡边缘稍隆起毛糙不齐,部分周边可见卫星灶,内皮面有内皮斑,角膜弥漫性雾状水肿,前房可见积脓,虹膜可见新生血管(图1B)。A,B组平均10d角膜水肿消失,瘢痕形成;C,D组15d时上皮基本愈合,可见瘢痕形成。3.9mol/L氢氧化钾湿片法检查,5d,4组均可查见菌丝、孢子(图2)。角膜标本接种于Sabouraud培养皿上,将其置于25℃下培养观察可见曲霉菌菌落形成(图3)。第7d A,B组未检出菌丝及孢子,C,D组未见菌丝,部分可见孢子,10d C组未见到孢子,D组有少量孢子。15d D组也未能检出孢子。

表 1 术后不同时间点各组兔眼结膜充血,房闪及新生血管的分级情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

	3d	5d	7d	10d	15d
充血 A 组	2.8 ± 0.1	2.1 ± 0.2	1.7 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.2
B 组	2.7 ± 0.2	2.2 ± 0.2	1.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.3 ± 0.2
C 组	2.8 ± 0.2	2.8 ± 0.2	2.4 ± 0.2	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2
D 组	2.6 ± 0.2	2.8 ± 0.1	2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.1
$\chi^2$	1.345	12.378	13.101	24.859	17.158
P	0.719	0.006	0.004	0.000	0.001
房闪 A 组	3.7 ± 0.2	2.2 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.3 ± 0.2	0.9 ± 0.2
B 组	3.7 ± 0.2	2.6 ± 0.2	1.6 ± 0.2	1.3 ± 0.2	0.6 ± 0.2
C 组	3.6 ± 0.2	2.4 ± 0.2	2.2 ± 0.1	2.0 ± 0.2	0.8 ± 0.2
D 组	3.7 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.0 ± 0.2	2.2 ± 0.1	1.0 ± 0.2
$\chi^2$	0.333	10.031	21.708	16.315	2.346
P	0.954	0.018	0.000	0.001	0.504
血管 A 组	0.1 ± 0.1	1.4 ± 0.3	1.6 ± 0.1	1.9 ± 0.6	2.1 ± 0.7
B 组	0.3 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.7 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.1
C 组	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.6	1.4 ± 0.2	1.7 ± 0.2	2.1 ± 0.1
D 组	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.1
$\chi^2$	2.323	11.568	8.193	11.054	5.620
P	0.508	0.009	0.042	0.011	0.132

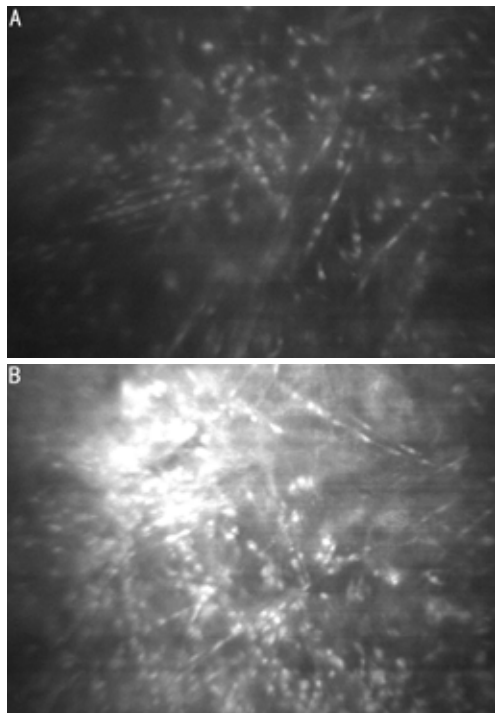


图 4 角膜共焦显微镜检查 A: 接种 7d; B: 曲霉菌接种 10d。

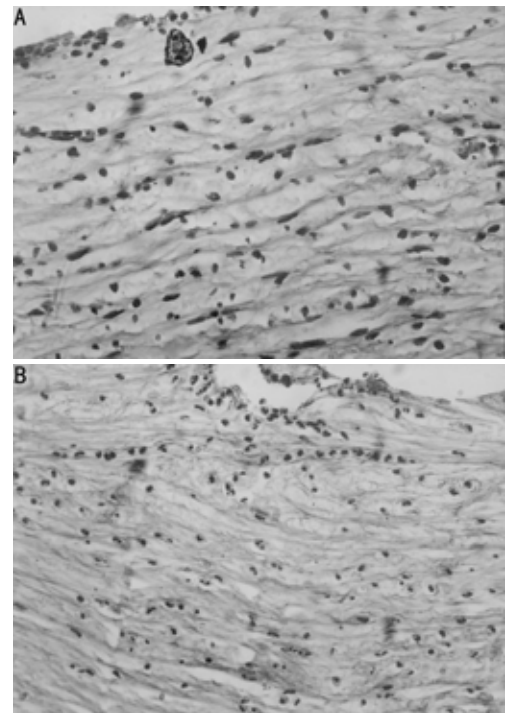


图 5 兔曲霉菌性角膜炎 A: PAS × 100; B: HE × 100。

**2.2 角膜共焦显微镜检查** 术后 5d, 4 组均可见较直, 短, 分支比较少的高反光菌丝及圆形分生孢子, 菌丝以垂直生长方式为主, 伴有少量炎性细胞浸润。术后 7d: 大量高反光, 较直, 长的菌丝, 以垂直生长方式为主, 圆形分生孢子聚集其周, 伴有较多炎性细胞浸润(图 4A)。A 组, B 组菌丝多见于角膜深基质层, C, D 组角膜全层均可见菌丝及孢子。术后 10d: 4 组均可见高反光菌丝及孢子明显减少(图 4B), 其周围有较多炎性细胞浸润, A, B 组见较多瘢痕反光, C, D 组可见部分瘢痕反光。术后 15d: 极少数斜形生长菌丝可见, C, D 组也可见到角膜基质细胞明显减少, 较多斑片状瘢痕组织可见(表 1)。

**2.3 病理学检查** 术后第 5d, 4 组 PAS 染色均可见少量菌丝平行生长于胶原纤维之间。C, D 组术后 7d 见大量菌丝斜行、垂直或平行生长于基质层(图 5A)。A, B 组术后 7d 基质层中仅见部分菌丝生长。术后 15d, 4 组均未见明显菌丝生长。术后第 5d, HE 染色 4 组均可见角膜基质细胞肿胀, 炎性细胞浸润不明显。术后第 7d, C 组, D 组见角膜基质细胞肿胀明显, 大量炎性细胞浸润, 以中性粒细胞为多(图 5B), 病灶局部也可见淋巴细胞、巨噬细胞。A, B 组细胞浸润不如 C, D 组显著。术后 15d 4 组均可见角膜基质细胞肿胀减轻, 角膜小面形成, 胶原纤维排列紊乱, 基质层炎性细胞浸润减少。4 组间无显著差异。

### 3 讨论

真菌性角膜溃疡对眼球结构和视功能破坏极大,是常见的致盲眼病,其治疗目前较为棘手,预后差。近10余年来角膜真菌病患率上升到首位,由原来的31.6%上升到46.5%,也就是说接近半数的感染性角膜病由真菌引起,而且患病率还有上升趋势。曲霉菌是我国真菌性角膜溃疡的常见致病菌之一<sup>[3]</sup>。我们采用标准曲霉菌菌株作为角膜溃疡感染病原菌。因为兔的真菌性角膜溃疡模型制作成功率低,且具有自愈现象。并且对于真菌性角膜溃疡的治疗,单纯全身用药不足以彻底控制角膜感染且全身并发症较多,仍应以积极的眼科治疗为主。因此,我们采用植片内皮面作“#”形划痕法制作角膜溃疡模型,局部应用来评判两性霉素B脂质体对曲霉菌的疗效。本实验我们制作动物模型时,用 $\phi$ 8mm的环钻钻取供体角膜片,并且只刮除受体角膜中央8mm上皮,可使病变部位与周围组织对比明显,易于观察,并有利于各组间治疗效果的比较。在供体角膜内皮面作“#”型划痕,将供体角膜缝合在受体角膜面上,有利于真菌菌液保留,使真菌能通过损伤的角膜上皮进入角膜间质,并在进入角膜间质后导致组织坏死和宿主的炎症反应,甚至穿透完整的后弹力层,并且避免了软性接触镜不宜固定的缺点。在供体角膜和受体角膜面之间接种真菌,可降低结膜囊内泪液对真菌接种浓度的稀释,提高真菌细胞与角膜细胞的黏附,减少泪液中所含有的溶菌酶、免疫球蛋白等抗菌成份对真菌生长的抑制,缝合眼睑则给真菌提供了适合生长繁殖的温度和湿度。AmB是多烯类抗真菌药物,早在20世纪50年代就已应用于抗真菌感染的治疗,是唯一治疗系统性真菌感染的药物,直到20世纪80年代才有所改变。AmB可以与真菌细胞膜上的麦角醇结合,导致真菌细胞内渗透压改变,钾离子及糖等内容物外渗,从而抑制真菌生长<sup>[3]</sup>。AmB本身可以嵌于细胞膜上,并在其上产生小孔。AmB可以与哺乳动物细胞膜上的胆固醇及类固醇微弱结合,这是其药物毒性存在的原因。脂质体(liposome)是近年发展起来的一种新型生物技术。它是将药物包封于类脂质双分子层内而形成的微型泡囊,是一种定时定向药物载体。因而具备一些其他制剂没有的特点。当AmB包埋入脂质体,其毒性可大大降低,这可能是由于:(1)脂质体在体内分布特异性,易被网状内皮系统(RES)内的巨噬细胞所吞噬而较多地分布在肝、脾等组织,在肾组织中分布较少,这就减少了两性霉素B对肾脏的作用;(2)AmB包被于脂质体中后,从肾小球滤过到达肾小管的AmB数量减少,在肾小管上皮细胞膜上的聚积减少;(3)AmBL进入体内后与高密度脂蛋白(HDL)结合占优势。这种结合不改变AmB对真菌细胞的作用,但对哺乳动物肾细胞,结合HDL的AmB及AmBL的毒性作用均降低。因此,当给药之后,脂质体

选择作用于真菌细胞膜,从而减轻了对人体细胞膜的作用,降低了毒性。现已证明,脂质体包埋AmB增强了对曲霉菌的抗菌作用<sup>[4,5]</sup>。

由于真菌性角膜炎病程长,易反复的特点,需要长期,频繁点眼。但两性霉素B在眼内的半衰期短,局部应用刺激性大,可能会造成患者用药依从性降低。不能维持角膜及前房内的有效抑菌浓度。两性霉素B脂质体剂型具有眼内半衰期长,药物利用度高,药效持久,并减少局部用药量及副作用的特点<sup>[6]</sup>。本研究中,A,B组平均7d角膜水肿减轻,大量角膜新生血管长入,10d角膜水肿消失,瘢痕形成。C组10d角膜上皮基本愈合。显示两性霉素B脂质体与两性霉素B相比较可以促进溃疡的愈合。缩短病程。术后7d,A,B组前房积脓显著减少,表明两性霉素B脂质体眼液的眼内通透能力强于两性霉素B眼液,能够更有效的控制角膜深基质层及前房内的真菌感染。第7d,A组,B组角膜共焦显微镜检查显示角膜深基质层可见少量真菌菌丝,而角膜刮片法未查出真菌菌丝,考虑与曲霉菌垂直性生长特性有关,曲霉菌性角膜溃疡病变后期,溃疡表面多为坏死组织,而真菌多生长于角膜基质层中。故临床诊治中不能因为角膜刮片检查阴性即认为角膜溃疡已治愈,角膜共焦显微镜的应用可以更加直观有效的观察角膜溃疡的治疗进程。裂隙灯显微镜检查时,我们使用了荧光素染色剂,但均未观察到A组,B组,C组有显著的球结膜着色现象,因而我们认为,本实验中5g/L AmBL眼液与2.5g/L AmBL眼液对球结膜均无显著的药物毒性。总之,两性霉素B脂质体眼液能够有效抑制曲霉菌性角膜溃疡的进展,促进溃疡的愈合,缩短治疗的时间,减少严重并发症的发生。实验中,未发现5g/L与2.5g/L AmBL眼液显著的药物毒性,因此,我们认为,2.5g/L AmBL眼液可以有效治疗曲霉菌性角膜溃疡。但临床治疗中,还需进一步研究不同浓度AmBL眼液治疗效果,刺激症状及药物毒性的差别。

#### 参考文献

- 1 王彦,黄海. 真菌耐药的研究进展. 药学服务与研究 2009;9(3):166-170
- 2 陈楠,杨一涛,谢立信. 两性霉素B眼内缓释系统对白色念珠菌性眼内炎影响的实验研究. 中国眼科杂志 2006;42(5):420-425
- 3 孙毅,邓应平. 真菌性角膜炎研究进展. 国际眼科杂志 2009;9(5):926-928
- 4 Thomas PA. Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clin Microbiol Rev* 2003;16(4):730-797
- 5 陈裕充,温海. 两性霉素B及其脂质体的抗真菌机制. 中国真菌学杂志 2006;1(5):312-314
- 6 马慕良. 两性霉素B脂质体和脂质复合体的临床应用. 国外医药抗生药分册 1996;17(4):289-291