

# 角膜胶原交联方法联合那他霉素抗真菌效果研究

潘士印, 安娜, 肖湘华, 程燕, 王养正, 刘先宁, 朱秀萍, 吴洁

基金项目: 陕西省自然科学基金项目 (No. 2012JM4023, 2011JE005); 陕西省社会发展科技攻关项目 (No. 2018SF-249); 陕西省卫生计生委科研基金项目 (No. 2016C004)

作者单位: (710002) 中国陕西省西安市第一医院眼科 陕西省眼科研究所 陕西省眼科学重点实验室 陕西省眼科疾病临床医学研究中心 西北大学附属第一医院

作者简介: 潘士印, 男, 毕业于中国科学院成都有机化学研究所, 硕士, 副研究员, 研究方向: 眼用药物及眼科基础研究。

通讯作者: 吴洁, 女, 毕业于西安交通大学医学院, 硕士, 主任医师, 副院长, 研究方向: 角膜、眼表疾病, wutu63@163.com

收稿日期: 2018-06-28 修回日期: 2018-12-06

## Antifungal effect of combined application of corneal collagen cross-linking and natamycin

Shi-Yin Pan, Na An, Xiang-Hua Xiao, Yan Cheng, Yang-Zheng Wang, Xian-Ning Liu, Xiu-Ping Zhu, Jie Wu

**Foundation items:** Natural Science Foundation of Shaanxi Province (No. 2012JM4023, 2011JE005); Shaanxi Province Social Development and Technology Research Project (No. 2018SF-249); Shaanxi Province Project of Scientific Research Fund for Health (No. 2016C004)

Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital; Shaanxi Institute of Ophthalmology; Shaanxi Key Laboratory of Ophthalmology; Clinical Research Center for Ophthalmology Diseases of Shaanxi Province; First Affiliated Hospital of Northwestern University, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China

**Correspondence to:** Jie Wu. Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital; Shaanxi Institute of Ophthalmology; Shaanxi Key Laboratory of Ophthalmology; Clinical Research Center for Ophthalmology Diseases of Shaanxi Province; First Affiliated Hospital of Northwestern University, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China. wutu63@163.com

Received: 2018-06-28 Accepted: 2018-12-06

## Abstract

• **AIM:** To Study the anti-fungal effect of corneal collagen cross-linking combined with natamycin *in vivo* and *in vitro*, so as to provide the treatment and experimental basis for the treatment of clinical fungal keratitis.

• **METHODS:** Three common pathogenic fungi (*Aspergillus flavus*, *Fusarium Solani* and *Candida albicans*) were used. The experimental group was divided into cross-linking combined natamycin group, natamycin combined riboflavin group, natamycin combined UVA

irradiation group, cross-linking group and natamycin group as the control group. The drug was added to the center of the Sabouraud dextrose agar (SDA) plate coated with liquid with each fungal spores with the same maid turbidity of 1.5. Ten minutes later, it was irradiated with collagen cross-linking instrument for 10min and cultured at 28°C for 36h, and then the inhibition zone size was measured and analyzed statistically. The rabbit model of *Fusarium Solani* corneal infection was prepared. The model rabbits were randomly divided into model control group, cross-linking treatment group, natamycin treatment group, cross-linking combined natamycin group, 5 rabbits in each group. And another 5 normal rabbits were taken as control, and five rabbits were irradiated in accordance with corneal collagen cross-linking therapy. The results were observed by anterior segment photography, corneal scraping and confocal microscopy, and the ultra micro structural changes of the corneas were observed by electron microscope after the treatment.

• **RESULTS:** Corneal collagen cross-linking alone had shown no effect on each fungus *in vitro*. Corneal collagen cross-linking combined with natamycin produced significant anti-fungal effect ( $P < 0.05$ ). However, the anti-fungal effect of natamycin combined riboflavin group and natamycin combined ultraviolet light group showed no statistical difference ( $P > 0.05$ ) comparing with the control group. For the model of rabbit fungal infection, the course of disease was about 14d in the natamycin group and CXL combined with natamycin group, and it was about 21d in CXL group. After the treatment, all the groups healed. There were no defects in the corneal epithelium, no mycelium in the corneas, except for more corneal neovascularization. The results of the anterior segment photography showed that the treatment effect of the cross-linking combined natamycin group was better than other groups, with fewer scar tissue, better corneal healing and relatively short course of disease.

• **CONCLUSION:** Corneal collagen cross-linking combined with natamycin treatment is able to enhance anti-fungal effect, promote corneal healing, and shorten the course of disease. So it is a promising therapeutic technique for the clinical treatment of fungal keratitis.

• **KEYWORDS:** corneal collagen cross-linking; combination; natamycin; fungal keratitis

**Citation:** Pan SY, An N, Xiao XH, et al. Antifungal effect of combined application of corneal collagen cross-linking and natamycin. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(1):14-20

## 摘要

**目的:**研究角膜胶原交联方法联合那他霉素应用时的体内外抗真菌效果,为临床真菌性角膜炎的治疗提供治疗方法及实验基础。

**方法:**采用黄曲霉菌、茄病镰刀菌、白色念珠菌三种常见致病真菌,实验组分为交联联合那他霉素组、那他霉素联合核黄素组、那他霉素联合紫外照射组、交联组,并用那他霉素组作为对照。将药物涂到有 1.5 麦氏浊度的真菌孢子悬液的沙堡弱琼脂培养基的中心,10min 后使用胶原交联仪照射 10min,之后 28℃ 培养 36h,测量抑菌圈并进行统计学分析。制备兔眼茄病镰刀菌感染模型,按随机数字表法将模型兔随机分为模型对照组、交联治疗组、那他霉素治疗组、交联联合那他霉素治疗组,每组 5 只;另取 5 只正常兔按照角膜胶原交联疗法进行照射,5 只正常对照。通过前节照相、角膜刮片、共焦显微镜等观察各组治疗结果,并在治疗结束后采用电镜观察角膜超微结构改变情况。

**结果:**体外单独应用角膜胶原交联术,对三种真菌均无效;当交联与那他霉素联合应用时,抗真菌效果均优于对照组,且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );那他霉素与核黄素、那他霉素与紫外线分别联合应用时,抗菌效果与对照组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。针对兔真菌感染模型,那他霉素治疗组及交联联合那他霉素治疗组病程约 14d,交联治疗组病程约 21d;经治疗后,各治疗组均已愈合,各组角膜上皮均无缺损,新生血管较多,角膜内无菌丝;前节照相结果显示,交联联合那他霉素治疗组治疗结果优于其它各治疗组,瘢痕组织较少,角膜愈合较好,病程相对短。

**结论:**角膜胶原交联方法联合那他霉素,可促进角膜愈合,缩短病程,增强抗真菌效果,有望为眼科临床真菌性角膜炎的治疗提供一种新的治疗技术。

**关键词:**角膜胶原交联;联合;那他霉素;真菌性角膜炎

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.1.03

**引用:**潘士印,安娜,肖湘华,等.角膜胶原交联方法联合那他霉素抗真菌效果研究.国际眼科杂志 2019;19(1):14-20

## 0 引言

真菌性角膜炎(fungal keratitis, FK)是一种严重的致盲性眼病,严重者可致角膜溶解穿孔,目前临床应用的抗真菌药物眼部通透性差,疗效不佳,最终患者甚至丧失眼球。相关统计研究均表明,真菌性角膜炎有逐年增加的趋势。据我所微生物检验室统计分析自 2000 年以来,真菌性角膜炎的检出率也呈上升趋势。目前临床常见真菌性角膜炎的致病菌为曲霉菌、镰刀菌、白色念珠菌等<sup>[1-4]</sup>。针对真菌性角膜炎,抗真菌药物往往因通透性差,疗效不佳或无效,甚至影响穿透或板层角膜移植手术治疗,是目前真菌性角膜炎治疗的难题,相关药物及治疗方法,一直是眼科研究的热点<sup>[5-6]</sup>。核黄素-紫外线 A 角膜胶原交联方法(corneal collagen cross-linking, CXL),是以核黄素作为光敏剂,通过紫外线 A 引起的光化学反应,产生活性氧,通过赖氨酸氧化通路诱导,产生共价键或者基质内胶

原的物理交联<sup>[7]</sup>。CXL 作为最新的治疗技术,在国内外已成功应用于圆锥角膜的治疗<sup>[8-9]</sup>,但在真菌性角膜炎领域,尚处于探索阶段。本文通过考察 CXL 联合那他霉素体外及体内眼部应用抗真菌效果,拟为该技术在临床真菌性角膜炎的治疗中的应用,提供实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验用真菌标准菌株** 黄曲霉菌、茄病镰刀菌、白色念珠菌标准菌株,购于陕西省微生物研究所。接种于沙堡弱培养基在 28℃ 恒温培养 48h 后生长良好,用液体沙堡弱培养基制备 1.5 麦氏浊度的真菌孢子悬液用于实验。

**1.1.2 实验动物** 8 周龄清洁级健康无眼疾新西兰白兔 30 只,体质量 1.5~2.0kg(西安交通大学医学院动物中心提供)。实验动物饲养与使用符合《中华人民共和国标准发布 2001 年第 10 号》标准,并通过陕西省眼科研究所伦理委员会审核。

**1.1.3 主要仪器与试剂** 胶原交联仪(瑞士 IROC AG 公司,Version2000 型,波长 365nm,紫外线光照能量 8.81mW/cm<sup>2</sup>,光圈大小 9mm),德国 Heidelberg 公司 HRT-III 激光扫描共聚焦显微镜,日本日立 H-7650 透射式电子显微镜,Topcon DC-3 裂隙灯前节照相系统。那他霉素滴眼液(华北制药股份有限公司,批号 120401),1g/L 核黄素(德国 MedioCROSS 公司,批号 11050215),沙堡弱琼脂及液体培养基(北京奥博星生物技术有限责任公司,批号 20100902)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 体外抗真菌效果研究

##### 1.2.1.1 核黄素与那他霉素比例对抗真菌效果的影响

取 1.5 麦氏浊度白色念珠菌悬液 100μL,加入到沙堡弱琼脂培养基上,在培养皿上涂布均匀。分别于培养皿中心加入 30μL 那他霉素-核黄素混合溶液(那他霉素滴眼液:核黄素溶液 = 1:0;1:3;1:1;3:1;0:1),10min 后用胶原交联仪照射 10min,再放入培养箱 28℃ 恒温培养 36h 后,测量抑菌圈并与未照射对照组比较,进行统计学分析。

**1.2.1.2 照射时间对抗菌效果的影响** 取 1.5 麦氏浊度白色念珠菌悬液 100μL,加入到沙堡弱琼脂培养基上。分别于培养皿中心加入 30μL 那他霉素-核黄素混合溶液(那他霉素滴眼液:核黄素溶液 = 1:1),10min 后用胶原交联仪分别照射 10、20min,28℃ 恒温培养 36h 后,测量抑菌圈并进行统计学分析。

**1.2.1.3 胶原交联联合那他霉素体外抗真菌效果** 实验分组:采用黄曲霉菌、茄病镰刀菌、白色念珠菌三种常见致病真菌,取 1.5 麦氏浊度真菌悬液 100μL,加入到沙堡弱琼脂培养基上,在培养皿上涂布均匀。每种菌分为实验组和对照组。对照组:于培养皿中心加入 30μL 那他霉素,28℃ 培养 36h 后,测量抑菌圈直径。实验组 1:交联联合那他霉素组,于培养皿中心加入 30μL 那他霉素-核黄素混合溶液(1:1),10min 后用胶原交联仪照射 10min,28℃ 培养 36h 后,测量抑菌圈直径并与对照组比较,进行统计学分析。实验组 2:那他霉素联合紫外照射组,于培养皿中心加入 30μL 那他霉素,10min 后用胶原交联仪进行紫外照射 10min,28℃ 培养 36h 后,测量抑菌圈直径并与对照组比较,进行统计学分析。实验组 3:那他霉素联合核黄素组,于培养皿中心加入 30μL 那他霉素-核黄素混合溶

表1 核黄素与那他霉素比例对抗菌效果的影响

实验分组	加入药量(μL)	药物比例(那他霉素:交联剂)	照射时间(min)	抑菌圈( $\bar{x} \pm s$ , mm)	t	P	
1	对照组	30	1:0	0	25.533±0.980	0.623	0.540
	实验组	30	1:0	10	25.283±0.985		
2	对照组	30	3:1	0	24.375±1.223	-3.780	0.001
	实验组	30	3:1	10	25.783±0.413		
3	对照组	30	1:1	0	25.156±0.941	-3.391	0.003
	实验组	30	1:1	10	26.575±0.941		
4	对照组	30	1:3	0	24.611±0.658	-2.562	0.021
	实验组	30	1:3	10	26.122±1.642		
5	对照组	30	0:1	0	0		
	实验组	30	0:1	10	0		

液(1:1), 28℃培养36h后, 测量抑菌圈直径并与对照组比较, 进行统计学分析。实验组4: 单独交联组, 于培养皿中心加入30μL核黄素溶液, 10min后用胶原交联仪照射10min, 28℃培养36h后, 测量抑菌圈直径并与对照组比较, 进行统计学分析。

### 1.2.2 兔眼部应用抗真菌效果研究

**1.2.2.1 兔眼真菌性角膜炎模型的制备** 按随机数字表法随机选取20只兔制备真菌性角膜溃疡模型。干燥保存的异种脱细胞角膜片复水备用, 速眠新0.4mL肌内注射麻醉兔, 右眼结膜囊内用盐酸奥布卡因滴眼液点眼2次, 间隔5min。铺无菌洞巾, 开睑器开睑, 直径7.5mm环钻行角膜中央压痕, 刮除中央角膜上皮, 无菌针头在其上划痕后涂抹1.5麦氏浊度的镰刀菌孢子悬液(陕西省眼科研究所提供)。复水后的异种脱细胞角膜片修剪为直径7.5mm的圆片, 对位平铺于兔角膜中央, 10-0尼龙线间断固定缝合角膜片, 角膜片下再注射1.5麦氏浊度的镰刀菌孢子悬液0.1mL, 黑丝线缝合眼睑。3d后拆除眼睑缝线, 行裂隙灯显微镜、眼前节照相和激光扫描共聚焦显微镜检查, 观察角膜镰刀菌的感染情况。

**1.2.2.2 实验分组** (1) 正常对照组: 5只健康兔作为正常对照组。(2) 交联对照组: 另取5只健康兔, 1g/L核黄素溶液点眼, 5min/次, 持续30min, 在裂隙灯显微镜的钴蓝光照射下确认核黄素已经进入前房。将实验兔置于兔夹, 开睑, 使用胶原交联仪照射角膜中央10min。(3) 模型对照组: 随机选取5只真菌性角膜炎模型兔, 作为模型对照组。(4) 交联治疗组: 随机选取5只真菌性角膜炎模型兔, 1g/L核黄素溶液点眼, 5min/次, 持续30min, 在裂隙灯显微镜的钴蓝光照射下确认核黄素已经进入前房。将实验兔置于兔夹, 开睑, 使用胶原交联仪照射角膜中央10min。(5) 那他霉素治疗组: 随机选取5只真菌性角膜炎模型兔, 那他霉素滴眼液点眼, 10min/次, 持续2h, 之后4次/d。(6) 交联联合那他霉素治疗组: 随机选取5只真菌性角膜炎模型兔, 那他霉素滴眼液点眼, 10min/次, 30min后加核黄素5min/次, 持续30min, 在裂隙灯显微镜的钴蓝光照射下确认核黄素已经进入前房。将实验兔置于兔夹, 开睑, 使用胶原交联仪照射角膜中央10min, 之后继续使用那他霉素滴眼液点眼, 10min/次, 共计5次, 累计治疗时间2h, 之后那他霉素滴眼液点眼4次/d。

**1.2.2.3 激光扫描共聚焦显微镜检查** 治疗后第3、7、14、21d分别行眼前节照相和共聚焦显微镜检查, 观察角

膜情况。盐酸奥布卡因滴眼液点眼2次, 在显微镜探头表面涂布2g/L卡波姆凝胶, 在探头前套上1个一次性无菌帽, 开睑器开睑, 助手固定兔头部, 通过调节主机上的手柄使戴有无菌帽的探头与兔受检眼角膜接触, 调节成像焦点平面, 通过CCD摄像头取像使角膜各层图像通过计算机屏幕快速显示并保存。

**1.2.2.4 各组角膜胶原纤维的超微结构检测** 治疗2wk后空气栓塞法处死所有实验兔, 剪取角膜组织, 行扫描电子显微镜检测。透射电镜样品制作及镜下观察: 将角膜组织切成1mm×1mm×3mm的小条, 经过25g/L戊二醛固定、0.1mol/L磷酸缓冲液浸洗、10g/L四氧化锇固定液固定、乙醇梯度脱水、环氧树脂浸透包埋聚合后切片, 切片美兰染色后进行超薄切片50~70nm, 醋酸铀、柠檬酸铅染色后, 日本日立H-7650透射式电子显微镜下观察、拍照。

统计学分析: 采用SPSS17.0统计软件, 本研究中的抑菌圈直径测量值以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 经Levene检验方差齐, 两组之间比较采用独立样本t检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体外抗真菌效果

**2.1.1 核黄素与那他霉素比例对抗菌效果的影响** 通过抑菌圈大小及统计学分析, 结果显示: CXL单独应用时对白色念珠菌无效; 在不加入交联剂, 单独应用紫外照射与那他霉素联合应用时, 两组抗菌效果接近, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); CXL与那他霉素联合应用时, 各实验组抗白色念珠菌效果优于未照射对照组, 且差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表1。

**2.1.2 照射时间对抗菌效果的影响** 根据2.1.1的实验结果, 为保证抗菌效果, 同时平衡那他霉素与核黄素的用量, 因此选用那他霉素: 核黄素=1:1的混合溶液进行下述实验。向涂有真菌菌液的培养皿中加入30μL那他霉素-核黄素混合溶液(1:1), 当使用角膜胶原交联仪照射时间为20min时抑菌圈大小(27.340±0.782mm)与照射10min组(27.325±0.857mm)比较, 差异无统计学意义( $t = 0.947, P = 0.371$ )。从实验结果可看出, 照射时间长并不能增加抗菌效果, 参照文献及实验结果, 后续实验照射时间均为10min。

**2.1.3 角膜胶原交联术联合那他霉素体外抗真菌效果** 针对黄曲霉菌、茄病镰刀菌、白色念珠菌三种实验菌, 通过

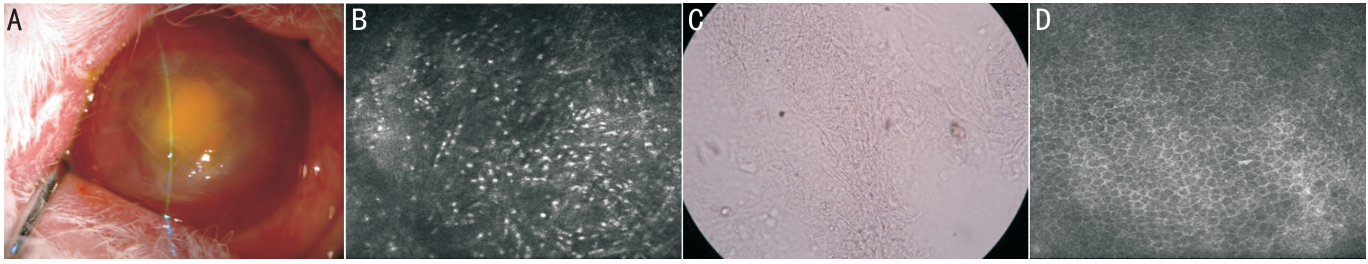


图1 兔眼真菌镰刀菌感染模型 A:前节照相照片;B:角膜共焦显微照片( $\times 800$ );C:角膜刮片检查( $\times 400$ );D:内皮检查( $\times 800$ )。

表2 交联联合那他霉素体外抗黄曲霉菌效果

实验分组	药物比例	照射时间 (min)	抑菌圈 ( $\bar{x} \pm s, \text{mm}$ )	P
对照组	那他霉素	0	19.6 $\pm$ 3.5	
实验组1	那他霉素:核黄素=1:1	10	28.0 $\pm$ 3.9	<0.01
实验组2	那他霉素	10	20.7 $\pm$ 0.6	0.890
实验组3	那他霉素:核黄素=1:1	0	20.6 $\pm$ 2.2	0.892
实验组4	核黄素	10	0	

注:P值表示各实验组与对照组之间抑菌圈大小的统计学分析结果。

表3 交联联合那他霉素体外抗茄病镰刀菌效果

实验分组	药物比例	照射时间 (min)	抑菌圈 ( $\bar{x} \pm s, \text{mm}$ )	P
对照组	那他霉素	0	28.3 $\pm$ 1.0	
实验组1	那他霉素:核黄素=1:1	10	33.4 $\pm$ 1.2	<0.01
实验组2	那他霉素	10	30.6 $\pm$ 0.6	0.052
实验组3	那他霉素:核黄素=1:1	0	29.4 $\pm$ 0.9	0.102
实验组4	核黄素	10	0	

注:P值表示各实验组与对照组之间抑菌圈大小的统计学分析结果。

表4 交联联合那他霉素体外抗白色念珠菌效果

实验分组	药物比例	照射时间 (min)	抑菌圈 ( $\bar{x} \pm s, \text{mm}$ )	P
对照组	那他霉素	0	26.7 $\pm$ 1.0	
实验组1	那他霉素:核黄素=1:1	10	27.6 $\pm$ 1.1	0.033
实验组2	那他霉素	10	27.0 $\pm$ 0.4	0.823
实验组3	那他霉素:核黄素=1:1	0	27.4 $\pm$ 1.1	0.112
实验组4	核黄素	10	0	

注:P值表示各实验组与对照组之间抑菌圈大小的统计学分析结果。

测量抑菌圈直径观察抗菌效果(表2~4)。实验组1与对照组相比,抗真菌效果均明显增强,且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );实验组4对三种菌均无效;当那他霉素与核黄素、那他霉素与紫外线分别联合应用时,即实验组2、3抗菌效果与对照组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 2.2 兔眼真菌感染模型抗真菌效果

**2.2.1 兔眼茄病镰刀菌感染模型** 角膜划痕联合异种脱细胞角膜片覆盖后3d,裂隙灯显微镜下可见角膜病灶区呈灰白色混浊,角膜上皮缺失,荧光素染色(+),角膜基质水肿;激光扫描共聚焦显微镜下可见角膜混浊灶呈坏死样高反光,其间见较多炎性细胞和真菌孢子,局部见短棒样、豆芽样菌丝,角膜刮片后显微镜下可见真菌菌丝及孢子,角膜后基质细胞肿胀、体积增大,呈多边形蜂窝状的激活状态,角膜内皮细胞肿胀失去规则六边形形态、边界不清,局部见炎性细胞浸润(图1)。

**2.2.2 交联联合那他霉素对兔眼真菌性角膜炎的治疗效果** 那他霉素治疗组及交联联合那他霉素治疗组病程约

14d,单独交联组病程约21d;经治疗后,各治疗组均已愈合,各组角膜上皮均无缺损,新生血管较多,浅基质层均见瘢痕形成,各组深基质层均无水肿,角膜内无菌丝;前节照相结果显示,交联联合那他霉素治疗组治疗结果优于其它各治疗组,瘢痕组织较少,角膜愈合较好,病程相对短;模型对照组病程约28d,上皮尚未完全愈合,瘢痕较深,新生血管密集,基质局部轻度水肿,角膜内无菌丝(图2、3)。各组兔角膜的超微结构改变:治疗后扫描电子显微镜检测结果显示:模型对照组未见上皮细胞,胶原纤维间有数量较多的细胞,成纤维细胞呈扁平状伸出较长的突起,细胞密度较高,可见发达的粗面内质网和线粒体;其余各组均见上皮细胞,正常对照组和交联对照组少见成纤维细胞;其余各模型治疗组有少量成纤维细胞,形状多不规则,有突起(图4,表6)。

## 3 讨论

真菌性角膜炎的治疗往往比较困难,早期诊断、及时治疗对真菌性角膜炎患者具有重要的意义。药物治疗和

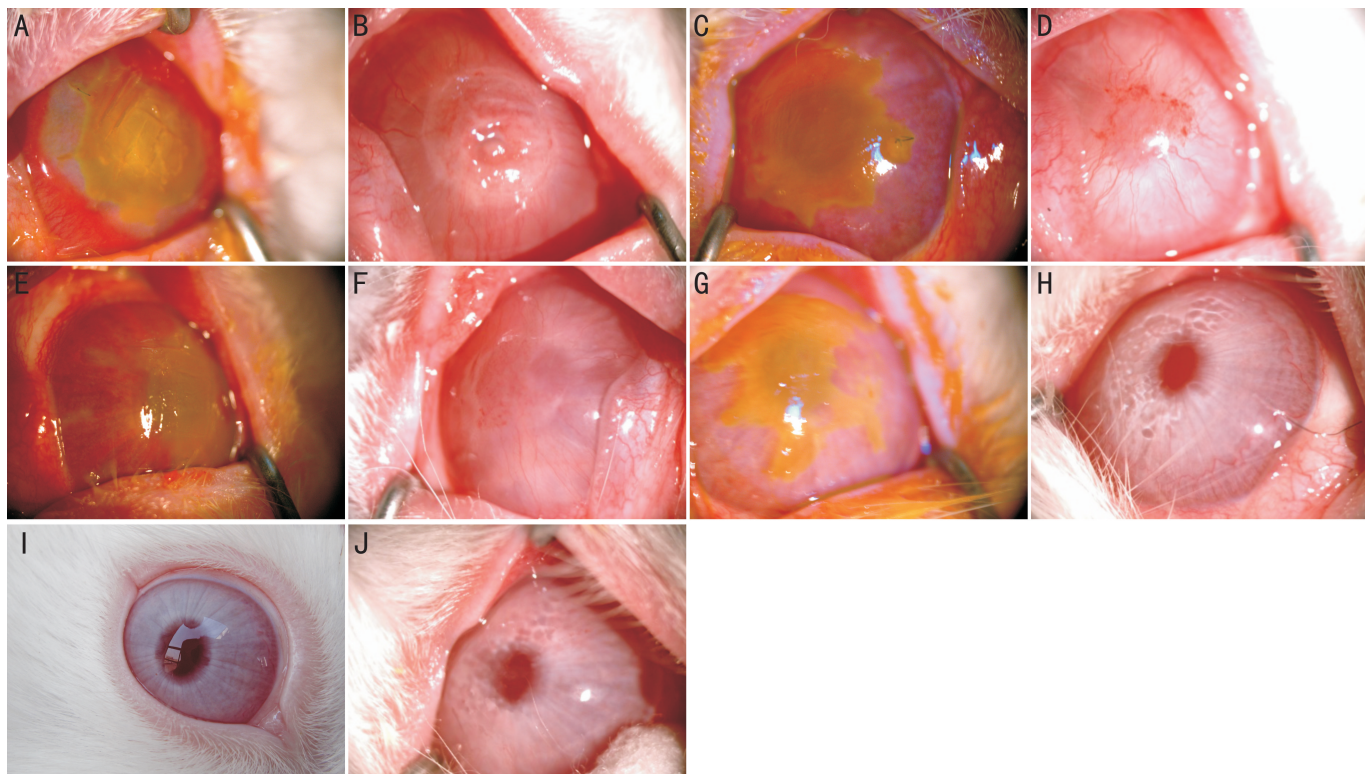


图2 兔真菌感染模型治疗前后前节照相 A:治疗前模型对照组;B:治疗后模型对照组;C:治疗前交联治疗组;D:治疗后交联治疗组;E:治疗前那他霉素治疗组;F:治疗后那他霉素治疗组;G:治疗前交联联合那他霉素治疗组;H:治疗后交联联合那他霉素治疗组;I:治疗前交联对照组;J:治疗后交联对照组。

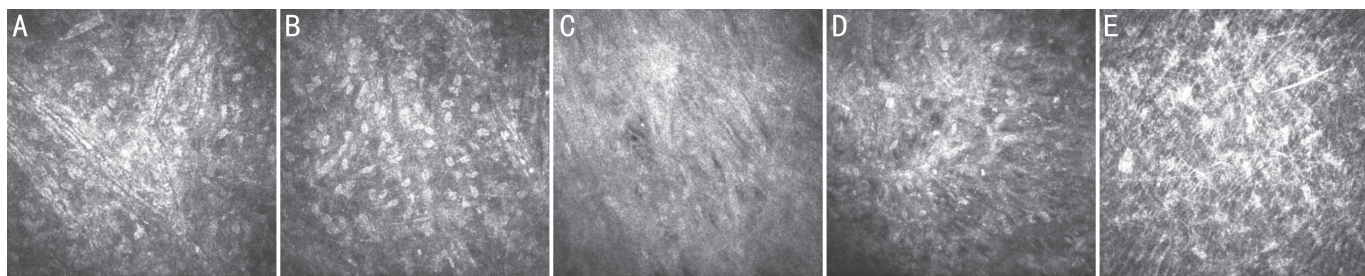


图3 治疗后兔真菌感染模型角膜共焦显微镜结果( $\times 800$ ) A:模型对照组;B:交联治疗组;C:那他霉素治疗组;D:交联联合那他霉素治疗组;E:交联对照组。

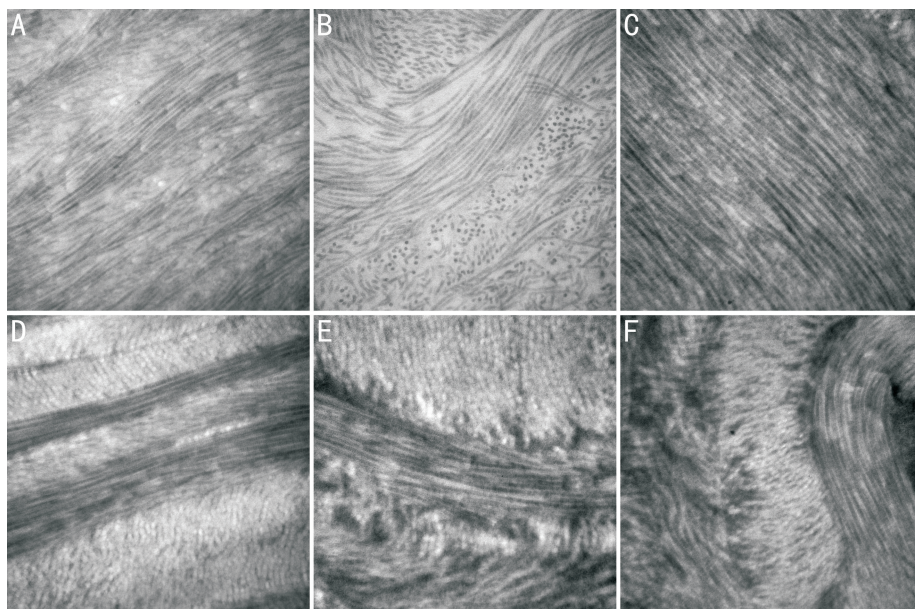


图4 治疗后各组角膜组织扫描电子显微镜检测结果( $\times 50000$ ) A:正常对照组;B:交联对照组;C:模型对照组;D:交联治疗组;E:那他霉素治疗组;F:交联联合那他霉素治疗组。

表 6 治疗后各组角膜组织扫描电子显微镜检测结果

分组	上皮细胞	胶原纤维束	纤维束直径( $\bar{x}\pm s$ , nm)	周期性横纹	成纤维细胞
正常对照组	可见	大量致密,横纵交错,排列整齐	24.6 $\pm$ 1.8	明显	少见
交联对照组	可见	排列紊乱,横纵交错	30.7 $\pm$ 2.1	明显	未见
模型对照组	未见	大量致密,排列整齐,较均匀	25.2 $\pm$ 1.4	明显	较多,扁平状伸出较长突起
交联治疗组	可见	大量致密,横纵交错,扭曲明显	43.6 $\pm$ 6.4 <sup>a,c</sup>	明显	少量,体积较小,形状不规则
那他霉素治疗组	可见	大量致密,横纵交错,扭曲明显	32.0 $\pm$ 3.0	明显	少量,扁平状,有细长突起
交联联合那他霉素治疗组	可见	大量,排列稍有紊乱	46.0 $\pm$ 4.6 <sup>a,c</sup>	明显	少量,体积较大,梭型,突起较长

注:<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 正常对照组;<sup>c</sup> $P<0.05$  vs 模型对照组。

手术治疗往往同时进行,相辅相成合理应用,才能达到提高治愈率的目的。研制理想的抗真菌药物,寻找更好的治疗手段是真菌性角膜炎治疗的重要方向。

核黄素-紫外线 A 胶原交联术除了在圆锥角膜领域广泛应用以外,近年来在眼部其它疾病治疗方面的应用研究也越来越多,如 Fuch 角膜营养不良<sup>[10]</sup>、大疱性角膜病变及细菌感染性角膜炎等<sup>[11-14]</sup>。针对真菌性角膜炎,Anwar 等<sup>[15]</sup>、Hao 等<sup>[16]</sup>报道了角膜胶原交联术联合两性霉素 B 治疗曲霉菌感染的角膜炎,联合应用后,病程缩短,上皮缺损面积减小,角膜浸润面积减小,避免了角膜穿孔的危险。但在 Martins 等<sup>[17]</sup>关于角膜胶原交联术抗体外细菌和真菌的效果研究中发现,胶原交联术对体外培养的白色念珠菌没有明显的抗菌效果,但与两性霉素 B 联合应用,则可显著提高其抗菌效果。Sauer 等<sup>[18]</sup>进一步的研究报道称,胶原交联术联合两性霉素 B 体外抗白色念珠菌、镰刀菌、曲霉菌,与单独应用两性霉素 B 相比,抑菌效果具有显著的差异。

本文针对黄曲霉菌、茄病镰刀菌、白色念珠菌三种实验真菌,实验结果显示,单独应用 CXL 无效;但 CXL 可增强那他霉素的抗真菌效果,二者具有相加作用。实验结果显示,相比单独应用那他霉素,核黄素-紫外线 A 联合那他霉素应用后,抗真菌效果显著增强,但是单独应用核黄素-紫外线 A,则无任何抗菌作用,从而考虑其机制为:多烯类抗真菌药物在真菌微膜上形成微孔,从而促进核黄素进入真菌细胞内,在紫外作用下影响真菌 DNA 的合成,从而产生协同抗菌作用,加强抗菌效果。如果单独应用核黄素与紫外照射,核黄素无法进入真菌细胞内对 DNA 产生影响,则无抗菌作用。那他霉素是通过在真菌胞浆膜上形成一个水溶性的孔道,同时改变胞浆膜的通透性,引起菌体细胞内容物外渗,导致真菌停止生长,最终死亡。文献报道<sup>[19]</sup>,核黄素在紫外线的的作用下,可以对细菌、病毒及白细胞的 DNA 产生影响。说明核黄素除了可进行胶原交联反应之外,还可以干扰 DNA 的合成。

采用角膜划痕联合异种脱细胞角膜片覆盖法制备真菌感染动物模型,裂隙灯显微镜、激光扫描共聚焦显微镜及角膜刮片等检查,均显示真菌感染动物模型成功,相比

传统划痕法、角膜基质层间注射法等模型动物制备方法,成功率高,症状明显。那他霉素治疗组及交联联合那他霉素治疗组病程约 14d,单独交联组病程约 21d,模型对照组病程约 28d;经治疗后,实验组愈合较好,可见,交联联合那他霉素体内治疗兔真菌性角膜炎,可促进角膜愈合,缩短病程,增强抗真菌效果,减少药物的使用周期。文献报道:在体治疗时,核黄素-紫外线 A 胶原交联术可通过提高胶原的物理交联,抑制角膜溶解,提高基质强度,在阻止真菌向组织内部生长的过程中,同时阻止了多烯类抗真菌药物的垂直扩散,提高了多烯类抗真菌药物的表层药物浓度,在联合杀菌的基础上进一步提升了抗菌效果<sup>[16]</sup>。

综上所述,角膜胶原交联联合那他霉素的治疗方法,在抗菌机制上,具有相加作用,那他霉素改变胞浆膜的通透性,核黄素从而更好地进入体内,在紫外线的作用下,联合产生更好的抗菌作用;在联合治疗真菌性角膜炎时,通过交联的作用,角膜胶原增大,基质强度增强,阻止了真菌向组织内部扩散,提高表层药物浓度。因此,从抗菌机制及物理改变方面,角膜胶原交联联合那他霉素共同治疗真菌性角膜炎,可促进角膜愈合,缩短病程,增强抗真菌效果,减少药物的使用周期,具有更好的应用前景。

#### 参考文献

- 1 王丽娅,杨子建,张月琴,等.河南地区真菌性角膜炎病因学及流行病学分析.中国实用眼科杂志 2006;24(3):331-333
- 2 罗知卫,李建南,李曦.真菌性角膜炎流行病学分析.世界中西医结合杂志 2010;5(9):778-779
- 3 包兴旺,杜新华,陆滨,等.真菌性角膜炎病原学及药敏结果分析.中华医院感染学杂志 2018;28(5):746-748
- 4 李正平,陈萍,张露文,等.真菌性角膜炎致病菌分布、耐药性及预后不良因素分析.医学研究杂志 2016;45(9):156-159
- 5 李奇,付玲玲.角膜交联疗法治疗真菌性角膜疾病的研究进展.国际眼科杂志 2017;17(7):1258-1260
- 6 罗顺荣,吴护平,林志荣,等.重视真菌性角膜炎个性化手术治疗的研究.中华眼科医学杂志(电子版)2018;8(1):1-8
- 7 Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet - a - induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*

2003;135(5):620-627

8 胡敏,曾庆延.不同经上皮角膜胶原交联方法治疗进展期圆锥角膜的早期疗效观察.国际眼科杂志 2018;18(1):45-49

9 张辰星,胡春明,熊洁,等.快速角膜胶原交联治疗进展期圆锥角膜的临床研究.国际眼科杂志 2017;17(10):1928-1931

10 Hafezi F, Dejica P, Majo F. Modified corneal collagen crosslinking reduces corneal oedema and diurnal visual fluctuations in Fuchs dystrophy. *Br J Ophthalmol* 2010;94(5):660-661

11 Ghanem RC, Santhiago MR, Berti TB, et al. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet - A in eyes with pseudophakic bullous keratopathy. *J Cataract Refract Surg* 2010;36(2):273-276

12 Moren H, Malmso M, Mortensen J, et al. Riboflavin and ultraviolet a collagen crosslinking of the cornea for the treatment of keratitis. *Cornea* 2010;29(1):102-104

13 Atia R, Jouve L, Knoeri J, et al. Corneal collagen cross-linking to treat infectious keratitis. *J Fr Ophthalmol* 2018;41(6):560-568

14 Khan YA, Kashiwabuchi RT, Martins SA, et al. Riboflavin and ultraviolet light a therapy as an adjuvant treatment for medically refractive

Acanthamoeba keratitis; report of 3 cases. *Ophthalmology* 2011;118(2):324-331

15 Anwar HM, El - Danasoury AM, Hashem AN. Corneal collagen crosslinking in the treatment of infectious keratitis. *Clin Ophthalmol* 2011;5:1277-1280

16 Hao ZQ, Song JX, Pan SY, et al. Corneal collagen cross-linking and liposomal amphotericin B combination therapy for fungal keratitis in rabbits. *Int J Ophthalmol* 2016;9(11):1549-1554

17 Martins SA, Combs JC, Noguera G, et al. Antimicrobial efficacy of riboflavin/UVA combination (365nm) *in vitro* for bacterial and fungal isolates: a potential new treatment for infectious keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(8):3402-3408

18 Sauer A, Letscher-Bru V, Speeg-Schatz C, et al. *In vitro* efficacy of antifungal treatment using riboflavin/UV - A (365nm) combination and amphotericin B. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(8):3950-3953

19 Kumar V, Lockerbie O, Keil SD, et al. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction; extent and consequence of DNA damage at the molecular level. *Photochem Photobiol* 2004;80(1):15-21