论著

文章编号:1000-5404(2009)06-0530-05

兔眼角膜基质内注射两性霉素B的安全性评价

瞿玲辉[1],谢汉平[1],李良毛[2],任 茜[1] ([1]第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038;[2]解放军第181医院眼科,广西桂林 541002)

摘 要:目的 探讨兔眼角膜基质内注射两性霉素B的安全性,寻找角膜基质内注射两性霉素B的安全浓度。**方法** 健康家兔20只(40眼)按随机数字表法分为5组(每组8眼)。A组:角膜基质内注射0.1 ml平衡盐溶液(BSS);B、C、D、E组角膜基质内分别注射0.1 ml浓度为5、10、15、20 μg/0.1 ml的两性霉素B注射液,每4天注射1次,共注射5次。观察角膜透明性、上皮完整性、角膜新生血管生长情况,测量角膜厚度,第5次注射后30 d处死动物,行角膜病理组织学检查、内皮细胞活性率测定及角膜内皮超微结构观察。**结果** 兔角膜基质内注射浓度为5、10 μg/0.1 ml的两性霉素B注射液后不影响兔角膜正常生理功能,角膜透明、上皮完整,角膜内皮细胞无异常,与BSS组比较,未见明显差异($P>0.05$)。15、20 μg/0.1 ml浓度组,角膜出现明显水肿,角膜上皮脱落,严重的角膜新生血管长入,与BSS组比较,差异显著($P<0.05$)。**结论** 角膜基质内注射药物可能是一种可选择的、简单易行的给药途经。两性霉素B的药物浓度在5 μg/0.1 ml、用量在0.1 ml范围内是安全的;两性霉素B的药物浓度在10 μg/0.1 ml、用量0.1 ml可能安全。角膜基质内注射安全浓度的两性霉素B可能是治疗顽固真菌性角膜溃疡的一种较好选择。

关键词: 两性霉素B;角膜基质内注射;角膜新生血管;兔

中图法分类号: R772.205;R965.3;R978.1 **文献标识码:** A

Intrastromal injection of amphotericin B in rabbit eyes: corneal toxicity?

QU Ling-hui[1], XIE Han-ping[1], LI Liang-mao[2], REN Qian[1] ([1]Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Ophthalmology, No. 181 Hospital of PLA, Guilin 541002, Guangxi Province, China)

Abstract: Objective To investigate the toxicity to cornea of intrastromal injection with amphotericin B in rabbits, and explore a safe range of antibiotic concentration. **Methods** Totally 20 healthy rabbits (40 eyes) were randomly divided into 5 groups with 8 eyes in each group. The eyes of group A received intrastromal injection of 0.1 ml balanced salt solution, and those of Group B, C, D and E received 0.1ml injection containing amphotericin B 5, 10, 15, and 20 μg respectively. Every rabbit received 4 intrastromal injections, once per 4 d. Corneal transparency, epithelial defect and corneal neovascularization were observed with slit lamp biomicroscopy, and corneal thickness was measured with ultrasonic pachymetry. In 30 d after the last injection, all rabbits were sacrificed and their corneas were removed. Pathological observations were carried out for corneal morphology, survival rate of the corneal endothelial cells and ultrastructure of corneal endothelium. **Results** In the rabbits of Group B and C, they had transparent and intact cornea, normal endothelial cells, and had no any different with those of Group A ($P>0.05$). However, when the concentration of amphotericin B increased to 15 and 20 μg in the 0.1 ml injection, the rabbits showed edema cornea, exfoliation of corneal epithelium and severe neovascularization, With significant differences compared with Group A ($P<0.05$). **Conclusion** Intrastromal injection of amphotericin B at the concentration of 5 or 10 μg per 0.1ml is safe to rabbit cornea.

Key words: amphotericin B; intrastromal injection; corneal neovascularisation

真菌性角膜炎是一种严重威胁视力的感染性角膜疾病。临床缺乏敏感、有效的抗真菌药物是此病治疗失败的主要原因。多烯类抗真菌药物两性霉素B对常见致病菌属均敏感,两性霉素B仍是治疗真菌性角膜炎的一线用药选择[1]。两性霉素B传统的给药途径是滴眼,但其水溶液不稳定,且穿透性差、生物利用

作者简介:瞿玲辉,女,湖南省醴陵市人,硕士研究生,主治医师,主要从事角膜疾病方面的研究,现在解放军第181医院眼科。电话:(023)68765377,E-mail:nuliqlhui@yahoo.cn

通信作者:谢汉平,E-mail:xiehanping@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2008-10-15;修回日期:2008-11-12

度低。两性霉素 B 角膜基质内注射直接将药物送达病灶深部,治疗顽固的真菌性角膜炎取得较好疗效[2]。角膜基质内注射两性霉素 B 对角膜有无毒性,在多少浓度范围内对角膜上皮细胞及内皮细胞无毒性,尚少见文献报道。本研究使用平衡盐溶液及浓度分别为 5、10、15、20 μg/0.1 ml 的两性霉素 B 行兔眼角膜基质内注射,以探讨这种给药途经的安全性和临床应用的可行性。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物与分组　　选择 20 只(40 眼)健康家兔(第三军医大学实验动物中心提供),雌雄不拘,体质量 2.0 ~ 2.5 kg,裂隙灯显微镜检查无眼部疾患。采用单纯随机数字表法分为 5 组(每组 8 只眼),A 组(BSS 组):角膜基质内注射 0.1 ml 平衡盐溶液(balanced salt solution,BSS);B、C、D、E 组角膜基质内分别注射 0.1 ml 浓度为 5、10、15、20 μg/0.1 ml 的两性霉素 B 注射液。

1.1.2　两性霉素 B 注射液的配制　　两性霉素 B 注射剂干粉(华北制药有限公司)使用灭菌注射用水配制成浓度为 0.15% 的液体,再用平衡盐溶液分别稀释成浓度为 5、10、15、20 μg/0.1 ml 的注射液[3],无菌操作,严格避光,4 ℃保存。

1.1.3　主要仪器　　超声角膜测厚仪(日本 NDEK 公司 UP-1000 型);SLM-2 裂隙灯显微镜(重庆康华科技有限公司)。

1.2　方法

1.2.1　兔眼角膜基质内显微注射　　采用氯胺酮(12.5 mg/kg)和硫喷托钠(12.5 mg/kg)分别于兔左右后腿肌肉注射全身麻醉后,固定于手术台上,用开睑器开睑,生理盐水冲洗结膜囊,0.4% 盐酸奥布卡因眼液(日本参天制药株式会社)1 滴滴于结膜囊,显微有齿镊固定眼球,用一次性 1 ml 注射器,30 G(规格为 0.3 mm × 13 mm)注射针,在距针尖 3 mm 处弯折 45°,使针尖与针体呈 135°夹角,于角膜缘内 2.5 mm 处沿角膜弧度进入基质层,缓慢注入 0.05 ml 药物。角膜因水合作用变白,药液注射完后针头仍停留约 1 min,以尽量减少渗漏。再于对侧角膜缘内 2.5 mm 处重复注射 1 次,每次注射总量约为 0.1 ml。每 4 天注射 1 次,共注射 5 次,每次注射避免在同一位置进针。操作过程如出现刺穿角膜进入前房,则该眼退出实验,并按相应要求补充实验眼。

1.2.2　兔眼的裂隙灯显微镜下检查　　分别于每次注射后的 1、3 d 及第 5 次注射后的 1、7、30 d 进行裂隙灯显微镜下检查、荧光素染色并照相。角膜水肿程度进行 0 ~ 4 级的评分[4],0 级:0 分,角膜完全透明;1 级:1 分,轻微的角膜水肿,可看清虹膜、瞳孔、晶状体的细节;2 级:2 分,中度的角膜水肿,可观察到虹膜、瞳孔、晶状体;3 级:3 分,严重的角膜水肿,无法看到晶状体,角膜上出现条纹;4 级:4 分,弥漫的角膜水肿,无法看到虹膜和晶状体。角膜新生血管进行 0 ~ 3 级的评定[1],0 级:无新生血管;1 级:少量新生血管局限于角膜缘(新生血管位于角膜缘内 2 mm);2 级:新生血管侵入超出角膜缘内 2 mm 但未侵及角膜中央区(即瞳孔区);3 级:新生血管侵入角膜中央区。

1.2.3　角膜厚度检测　　分别于每次注射后的 1、3 d 及第 5 次注射后的 1、7、30 d 裂隙灯显微镜下检查后行角膜厚度测量,安抚动物,将角膜正中央作为测量点,测量 5 次取平均值。

1.2.4　角膜内皮细胞的活性观察　　于第 5 次角膜基质内注射后 30 d,在全身麻醉下耳缘静脉注入空气处死实验兔,剖取完整角膜片,每组任选 6 只角膜片行 0.25% 台盼蓝和 1% 茜素红联合染色,计算角膜内皮细胞活性率。

1.2.5　角膜组织病理学检查　　于第 5 次角膜基质内注射后 30 d 处死实验兔,每组任选 1 只角膜片,行 HE 染色,在Olympus CX21 生物显微镜下观察。

1.2.6　角膜内皮细胞超微结构的观察　　于第 5 次角膜基质内注射后 30 d 处死实验兔,每组任选 1 只角膜片,显微镜下取瞳孔区 1 mm × 2 mm 大小组织块,制作超薄切片,在荷兰飞利浦 TECNAI10 透射电镜下,观察角膜内皮细胞超微结构。

1.2.7　实验研究方法　　整个研究过程采用双盲法。实验操作、仪器测量、数据分析分别由不同人员完成。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,对角膜混浊程度评分及角膜测厚值进行重复测量数据方差分析,对角膜新生血管分级采用多组秩和检验(K-WH 检验),两两比较采用 Wilcoxon 秩和检验,对角膜内皮细胞活性率采取随机区组单因素方差分析。

2　结果

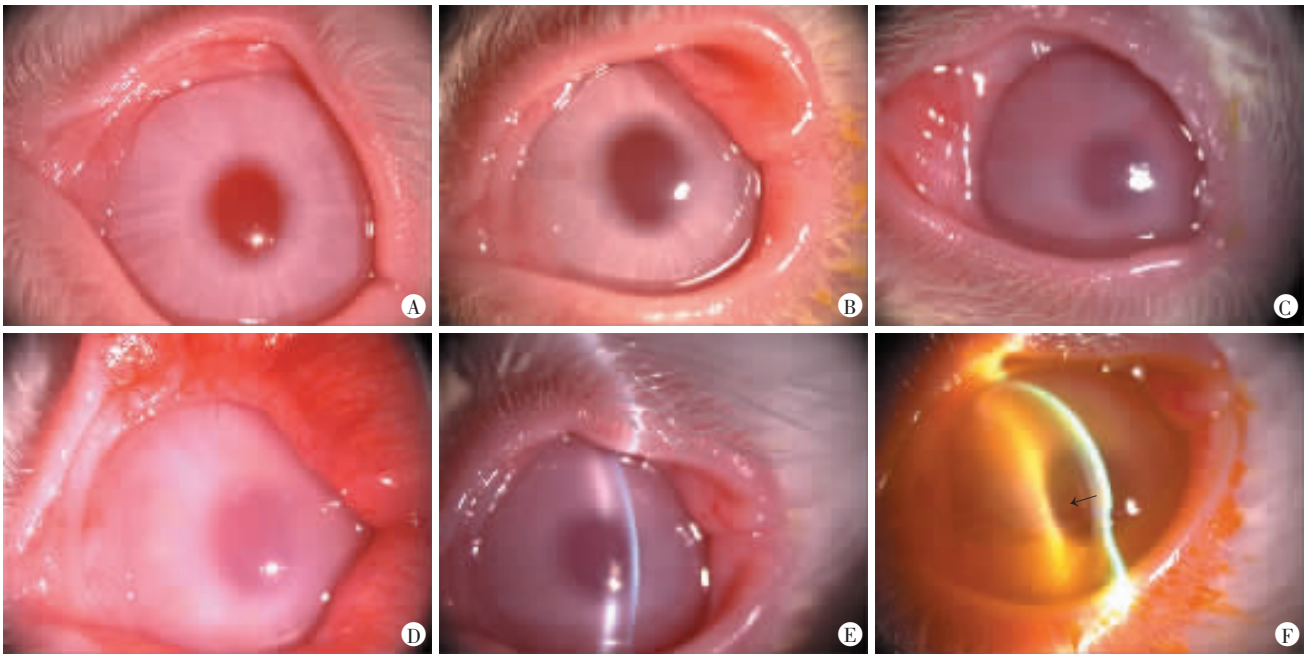
2.1　各组兔眼角膜水肿观察

BSS 组在整个实验过程中无或者是极轻微的角膜水肿(图 1A),5 μg/0.1 ml 浓度组在第 4 次及第 5 次注射后的 24 h 有 2 个角膜出现中度角膜水肿(图 1B),24 h 水肿消退,10 μg/0.1 ml 浓度组在整个实验过程中有 3 个角膜出现中度的角膜水肿,至第 4 次及第 5 次注射后的 24 h 其中 2 个角膜出现重度角膜水肿(图 1C),24 ~ 48 h 均能恢复透明,15、20 μg/0.1 ml 浓度组在第 2 次注射及以后每次注射完后的 24 h 分别有 5 个和 6 个角膜出现弥漫的角膜水肿雾浊(图 1D、E),72 h 不能恢复透明。但在第 5 次注射后的 30 d 观察,15、20 μg/0.1 ml 的浓度组角膜基本也已恢复透明,没有角膜出现大泡性角膜病变。20 μg/0.1 ml 浓度组在第 2 次注射及第 5 次注射后 24 h 各有 2 个角膜基质层可见黄白色药物结晶形成(图 1F),72 h 结晶均可吸收。

两性霉素 B 角膜基质内注射药物浓度越高,角膜水肿越严重(图 2):角膜水肿分级评分的 5 个组间比较,差异有统计学意义($F = 270.558$, $P < 0.01$);随注射次数的增多,角膜水肿程度加重($F = 82.951$, $P < 0.01$);BSS 组与 5、10、15、20 μg/0.1 ml 浓度组不同时间点两组之间相互比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

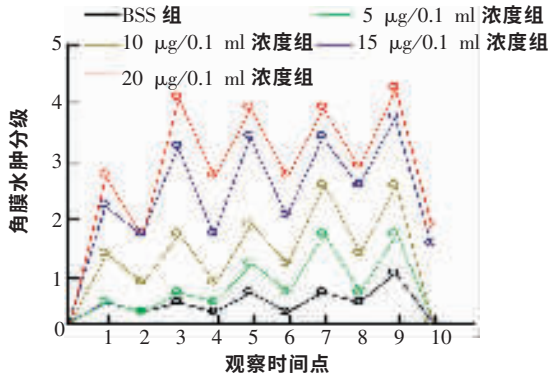
2.2　各组兔眼角膜上皮受损程度观察

BSS 组、5 μg/0.1 ml 浓度组在整个实验过程均未见明显的上皮受损,10 μg/0.1 ml 浓度组有 3 个角膜可见小片状上皮脱落,24 h 内修复。15、20 μg/0.1 ml 浓度组角膜每次注射后的 24 h 均可见片状角膜上皮脱落,弥漫性斑点,并可见浅基质层斑点状着色(图 3)。



A：BSS 组；B：5 μg/0.1 ml 浓度组；C：10 μg/0.1 ml 浓度组；D：15 μg/0.1 ml 浓度组；E：20 μg/0.1 ml 浓度组　弥漫角膜水肿；F：20 μg/0.1 ml 浓度组　↑：角膜基质层药物结晶

图 1　各组实验兔角膜水肿裂隙灯显微镜下观察结果　（×16）



0：注射前；1、3、5、7、9：依次为每次注射后的 1 d；2、4、6、8：依次为每次注射后的 3 d；10：第 5 次注射后的 30 d

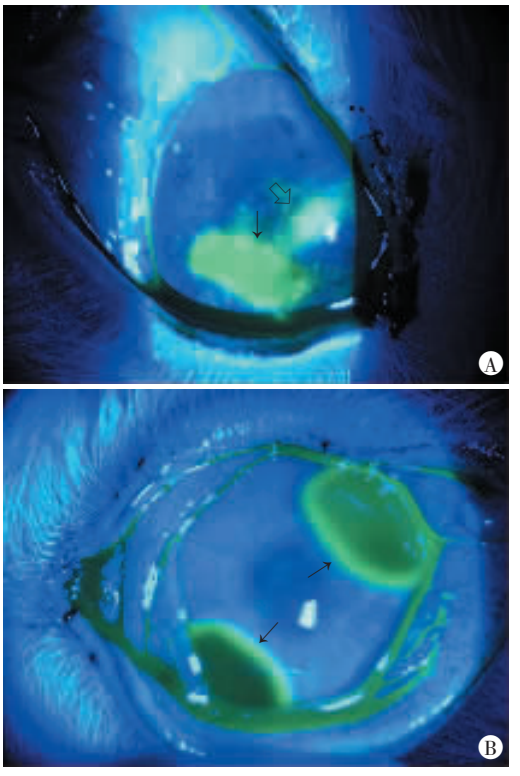
图 2　各组实验兔在不同观察时间点的角膜水肿分级

2.3　各组兔眼角膜新生血管（corneal neovascularization，CNV）观察

5 组实验兔角膜新生血管分级差异有统计学意义（$\chi^2 = 30.044$，$P < 0.01$），药物浓度越高，CNV 越严重。与 BSS 组比较，10、15、20 μg/0.1 ml 浓度组新生血管分级差异有统计学意义（$P < 0.05$）。与 5 μg/0.1 ml 浓度组比较，15、20 μg/0.1 ml 浓度组新生血管分级差异有统计学意义（$P < 0.05$），BSS 组、10 μg/0.1 ml 浓度组新生血管分级差异无统计学意义（$P > 0.05$，表 1、图 4）。

2.4　各组兔眼角膜厚度测量

注射药物浓度越高，角膜厚度的改变越明显：不同测量时间点 5 组兔角膜测厚值差异有统计学意义（$F = 299.900$，$P < 0.01$）；角膜测厚值有随时间变化的趋势且时间因素的作用随分组的不同而不同（$F = 62.705$，$P < 0.01$）。BSS 组角膜测厚值在整个实验过程基本无明显变化；5、10 μg/0.1 ml 的浓度组前 3 次注射后角膜厚度增加不显著，至第 4 次及第 5 次注射后角膜测厚值增加达 200～300 μm；但 15、20 μg/0.1 ml 的浓度组在第 2 次注射后角膜测厚值就增加达 300～450 μm。角膜厚度的增加与角膜水肿雾浊程度变化是一致的（表 2）。

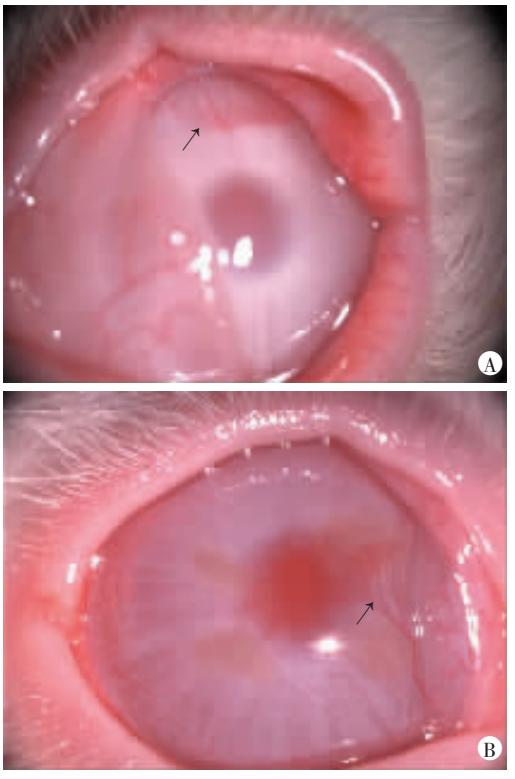


A：15 μg/0.1 ml 浓度组　↑：片状上皮脱落，⇧：浅基质层斑点着色；B：20 μg/0.1 ml 浓度组　↑：片状上皮脱落，荧光素着色

图 3　兔角膜上皮受损程度观察　（×16）

表 1　各组兔角膜新生血管生长情况

组别	分级			
	0 级	1 级	2 级	3 级
BSS 组	8	0	0	0
5 μg/0.1 ml 浓度组	6	2	0	0
10 μg/0.1 ml 浓度组	3	3	2	0
15 μg/0.1 ml 浓度组	0	2	4	2
20 μg/0.1 ml 浓度组	0	0	5	3



A:15 μg/0.1 ml 浓度组　↑: 角膜新生血管超出角膜缘内 2 mm;
B: 20 μg/0.1 ml 浓度组　↑: 角膜新生血管达角膜中央区

图 4　兔角膜新生血管观察　(×16)

2.5　各组兔眼角膜内皮细胞活性观察

5 个实验组之间角膜内皮细胞活性率差异有统计学意义($P<0.05$),15、20 μg/0.1 ml 浓度组损伤或死亡的内皮细胞数显著大于 BSS 组及 5 μg/0.1 ml 浓度组($P<0.05$),BSS 组、5 μg/0.1 ml 和 10 μg/0.1 ml 浓度组之间两两比较损伤或死亡的角膜内皮细胞数差异不显著($P>0.05$,表 3)。

表 3　各组兔角膜内皮细胞活性率比较(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	角膜内皮细胞活性率
BSS 组	99.83±0.41
5 μg/0.1 ml 浓度组	99.66±0.52
10 μg/0.1 ml 浓度组	99.17±0.75
15 μg/0.1 ml 浓度组	98.25±0.61^{ab}
20 μg/0.1 ml 浓度组	97.50±1.38^{ab}
F	8.957
P	0.000

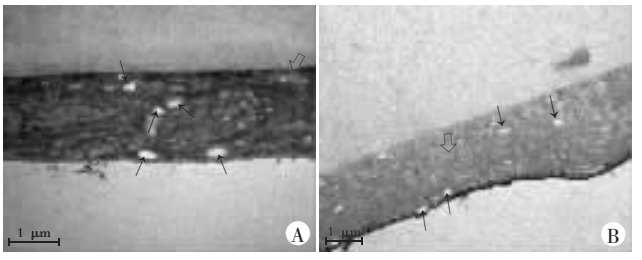
a:$P<0.05$,与 BSS 组比较;b:$P<0.05$,与 5 μg/0.1 ml 浓度组比较

2.6　各组兔眼角膜组织病理学检查

5 组实验兔角膜 5 层组织结构层次清晰,上皮连续完整,角膜基质纤维呈板层排列,纤维走行规整,排列紧密,除 20 μg/0.1 ml 浓度组动物角膜内皮层有部分脱落外,其余 4 组角膜内皮层完整,与后弹力层结合紧密。

2.7　各组兔眼角膜内皮细胞超微结构变化

BSS 组、5 μg/0.1 ml 和 10 μg/0.1 ml 浓度组内皮细胞透射电镜检查基本正常,细胞膜完整,细胞核膜连续,线粒体有小部分轻微肿胀,内质网平滑,细胞核结构完整清晰,细胞内极少空泡,15 μg/0.1 ml 和 20 μg/0.1 ml 浓度组角膜透射电镜观察显示细胞膜均完整,线粒体肿胀,细胞内有较多空泡,整个细胞内结构欠清晰(图 5)。



↑:细胞内空泡;⇧:肿胀的线粒体
A: 15 μg/0.1 ml 浓度组(×12 500); B: 20 μg/0.1 ml 浓度组

图 5　兔角膜内皮细胞透射电镜观察

3　讨论

3.1　角膜基质内注射给药途径的探讨

近年来,眼部给药系统研究正成为眼科和药学界的热门课题[5],传统眼部给药途径有:滴眼、结膜下注射、玻璃体腔注射、球周注射等。现有各种新型眼部给

表 2　各组兔角膜在不同时间测取的角膜厚度值(μm, $\bar{x}\pm s$)

组别	注射前	第 1 次注射后		第 2 次注射后		第 3 次注射后		第 4 次注射后		第 5 次注射后	
		1 d	3 d	1 d	3 d	1 d	3 d	1 d	3 d	1 d	7 d
BSS 组	376.7±10.4	374.2±5.4^{b}	373.7±9.0^{b}	375.3±14.7^{b}	376.3±9.6^{bc}	397.5±12.3^{bc}	398.0±11.5^{bc}	411.7±10.4^{bc}	417.3±12.0^{bc}	435.3±12.9^{bc}	375.8±14.7^{b}
5 μg/0.1 ml 浓度组	383.3±11.1	378.7±18.5^{b}	373.3±13.9^{b}	380.3±11.8^{b}	417.3±18.3^{ab}	448.7±14.8^{ab}	449.5±18.2^{ab}	586.3±22.8^{ab}	509.7±50.0^{ab}	659.3±25.9^{ab}	387.2±9.8^{b}
10 μg/0.1 ml 浓度组	375.8±14.9	442.3±64.2^{ac}	399.0±38.4^{abc}	471.5±62.4^{abc}	444.9±45.3^{ab}	509.8±27.1^{abc}	458.2±29.7^{ab}	566.3±44.9^{ab}	480.2±23.4^{ab}	663.8±51.4^{ab}	382.5±21.1^{b}
15 μg/0.1 ml 浓度组	376.8±6.7	505.5±53.4^{ac}	423.7±15.8^{ac}	701.0±10.2^{abc}	625.7±7.5^{abc}	648.3±12.3^{abc}	536.5±20.1^{abc}	652.5±11.7^{abc}	617.0±8.9^{abc}	642.3±10.7^{ab}	420.5±6.3^{abc}
20 μg/0.1 ml 浓度组	381.5±6.9	475.8±9.7^{ac}	425.0±8.1^{ac}	814.5±17.7^{ac}	661.5±19.6^{ac}	742.3±11.0^{ac}	722.5±7.3^{ac}	739.8±7.8^{ac}	703.0±7.6^{ac}	735.2±5.9^{ac}	453.3±6.9^{ac}

a: $P<0.01$,与 BSS 组比较;b:$P<0.01$,与 20 μg/0.1 ml 浓度组比较;c: $P<0.01$,与 5 μg/0.1 ml 浓度组比较

药系统,包括缓释滴眼液、膜控释药系统、眼植入剂、透巩膜释药系统、胶体系统、聚合凝胶等。对于眼表疾病,滴眼无创、方便,但也存在许多缺点,如药物滴眼后,立即被结膜囊内的泪液稀释,并很快从泪道排出,因此生物利用度低,作用时间亦极为短暂。寻找一种能将定量的药物直接递送至病变组织从而有效发挥作用成为当务之急。Jiang 等[6]通过浸渍涂膜法将药物涂抹使之包裹在长约 500 ~ 700 μm 的显微针上,然后直接将显微针注入角膜或巩膜,研究表明包裹药物的显微针能够通过角膜及巩膜有效递送药物,使局部眼组织达到较高的药物浓度,延长作用时间,提高生物利用度,但显微针的制作及药物的涂抹均需要较成熟技术支持,国内尚不能推广。角膜基质内注射可直接将药液送达病变角膜组织,对角膜的创伤小、操作容易且简单易行。角膜基质内注射 BSS 液体、5 μg/0.1 ml 及 10 μg/0.1 ml 浓度的两性霉素 B,虽然操作间隔时间较短、次数较多,但对角膜组织形态及正常的生理功能没有显著影响。Arenas 等[7]报道角膜基质内注射类固醇激素治疗角膜移植术后的排斥反应取得较好的疗效。袁进等[8]报道角膜基质内注射可将外源性基因安全的、相对高效的转入角膜组织,而无论是点眼或是前房注射,均未能从角膜基质细胞中检出报告基因产物。

Garcia-Valenzuela 等[2]认为:角膜基质内注射浓度为 5 μg/0.1 ml 浓度的两性霉素 B,对于穿透性角膜移植术后反复发作的真菌性角膜炎和眼内炎,是一种创伤性较低、方便易行的有效治疗方法,作者简要提及动物实验表明此浓度的两性霉素 B 对角膜无毒性,这与本实验结果一致。本实验结果显示浓度为 10 μg/0.1 ml 浓度的两性霉素 B 对兔眼角膜无明显毒性。Prakash 等[9]报道角膜基质内注射伏立康唑治疗深层真菌性角膜炎取得较好疗效。本实验结果提示:角膜基质内注射直接将两性霉素 B 送达角膜基质层,在一定的药物浓度及量范围内,对角膜是安全的。角膜基质内注射药物简单可行,此给药途径可能是治疗顽固真菌性角膜溃疡的一种较好选择。

3.2 角膜基质内注射两性霉素 B 的安全浓度及安全剂量

15 μg/0.1 ml 及 20 μg/0.1 ml 浓度组 CNV 严重,可能原因是角膜组织严重水肿而引起。正常角膜的无血管化是由于角膜基质层紧密排列的板层纤维屏障阻止了血管的侵入,角膜水肿时使紧密排列的层状胶原分开,屏障功能消除,新生血管芽和侵入细胞如多形核白细胞侵入,角膜各种浸润细胞(包括内皮细胞和炎性细胞)所释放的各种血管生长因子、血管生成抑制因子和蛋白酶等发挥作用,从而导致 CNV 生长[10]。本实验中两性霉素 B 浓度越高,角膜水肿越明显,CNV 越严重,但是两性霉素 B 注射后导致角膜水肿,致 CNV 产生的具体机制尚有待进一步研究。

在一定的药物浓度及用量范围内,角膜基质内注射药物对角膜是安全的,超出安全范围内的浓度及剂量,则会造成角膜明显损伤,所以掌握药物的安全浓度及用量的范围至关重要。角膜基质内注射作为一种有创操作,可能会并发刺穿角膜导致角膜穿孔、前房消失、眼内炎等疾病,需要操作者小心谨慎,注意无菌操作,并在手术显微镜下进行。本实验中有 3 个角膜在操作过程中不慎刺穿,注射针进入前房,其中 1 只眼 3 d后出现前房积脓并最终导致眼内炎。为了避免刺穿角膜,我们将 30 G 注射针头做了一定改造,在距针尖 3 mm 处弯折 45°,使针尖与针体呈 135°夹角,使进针与角膜弧度平行,容易定位于角膜基质层,在进针及沿角膜弧度滑行过程中都能尽量避免刺穿角膜。

本研究表明角膜基质内注射药物可能是一种可选择的、简单易行的给药途经,两性霉素 B 的药物浓度在 5 μg/0.1 ml、用量在 0.1 ml 范围内是安全的,对角膜不具有明显毒性,两性霉素 B 的药物浓度在 10 μg/0.1 ml、用量 0.1 ml 可能安全。角膜基质内注射安全浓度的两性霉素 B 可能是治疗顽固真菌性角膜溃疡的一种较好选择。

参考文献:

[1] Yavas G F, Ozturk F, Kusbeci T, *et al*. Antifungal efficacy of voriconazole, itraconazole and amphotericin B in experimental fusarium solani keratitis[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2008, 246(2): 275 - 279.

[2] Garcia-Valenzuela E, Song C D. Intracorneal injection of amphotericin B for recurrent fungal keratitis and endophthalmitis[J]. Arch Ophthalmol, 2005, 123(12): 1721 - 1723.

[3] Yoon K C, Jeong I Y, Im S K, *et al*. Therapeutic effect of intracameral amphotericin B injection in the treatment of fungal keratitis[J]. Cornea, 2007, 26(7): 814 - 818.

[4] 蒋 劲, 姚 克, 章 征. 不同浓度国产聚维酮碘对兔角膜毒性损伤的评价[J]. 中华眼科杂志, 2006, 42(4): 338 - 340.

[5] 陈祖基. 重视眼部给药系统的研究[J]. 中华眼科杂志, 2006, 42(4): 292 - 295.

[6] Jiang J, Gill H S, Ghate D, *et al*. Coated microneedles for drug delivery to the eye[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(9): 4038 - 4043.

[7] Arenas E, Navarro M, Mieth M A. Intracorneal depot steroids for the treatment of corneal rejection after keratoplasty[J]. Arch Soc Esp Oftalmol, 2004, 79(2): 75 - 79.

[8] 袁 进, 陈家祺, 周世有, 等. 阳离子聚合体介导下角膜基质注射 GFP 基因及其表达[J]. 眼科研究, 2005, 23(3): 225 - 227.

[9] Prakash G, Sharma N, Goel M, *et al*. Evaluation of intrastromal injection of voriconazole as a therapeutic adjunctive for the management of deep recalcitrant fungal keratitis[J]. Am J Ophthalmol, 2008, 146(1): 56 - 59.

[10] 徐锦堂, 孙秉基, 方海洲. 眼表疾病的基础理论与临床[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2002: 141 - 142.

(编辑 王小寒)