基础研究 文章编号:0253-3626(2009)09-1242-04

局部与全身应用伊曲康唑治疗曲霉菌性角膜炎的实验对照研究

刘晓熹[1],李平华[1],鄢秀菊[2],陈应兰[3]
(1. 重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016;2. 重庆市第一人民医院眼科,重庆 400010;
3. 重庆市第七人民医院眼科,重庆 400054)

【摘 要】目的:探讨局部与全身以及联合方式应用伊曲康唑对实验性曲霉菌性角膜炎的疗效。方法:32 只新西兰白兔角膜成功接种烟曲霉菌后随机分 4 组。分别给于灌胃伊曲康唑胶囊 40 mg/kg,bid(口服组)、1%伊曲康唑混悬液点眼 8 次 /d(点眼组)、点眼同时联合口服治疗剂量同前两组(联合组)、空白对照组。各组治疗后第 1、3、6、10、15、20、25 d 裂隙灯照相比较临床评分,记录并发症。于治疗第 3、6、15、25 d 行角膜菌丝刮片、真菌培养及病理学检查。结果:治疗第 1、3 d,各组临床评分比较无统计学差异;治疗第 6 d 后,3 治疗组临床评分均低于对照组且有统计学差异($P<0.01$),但治疗组间比较无显著差异;治疗第 15 d 后,点眼组和联合组临床评分均低于口服组且差异有显著性($P<0.05$),但点眼组与联合治疗组比较则无显著差异。3 个治疗组真菌阳性培养率在治疗后第 6 d 明显低于对照组($P<0.05$),并发症发生率明显低于对照组($P<0.05$)。结论:实验性曲霉菌性角膜炎的治疗以局部用药为主,全身用药并非必须。

【关键词】曲霉菌;角膜炎;伊曲康唑;治疗
【中国图书分类法分类号】R772.21 【文献标识码】A 【校稿日期】2008-01-22

Comparison of efficacy of oral, topical and oral & topical itraconazole treatment for experimental Aspergillus keratitis

LIU Xiao-xi, et al
(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the therapeutic role of topical, oral and combine of itraconazole treatment using a rabbit model of Aspergillus fumigatus keratitis. *Methods*: The epithelium was removed from the central cornea and the inoculum of Aspergillus fumigatus blastoconidia was placed on the corneal surface and covered with a contact lens. Forty-eight hours later the 32 rabbits were randomly divided into four groups. In topical group, rabbits were treated with topical itraconazole(1%, eight times daily); in oral group, rabbits received oral itraconazole (40 mg/kg, bid); *in combine of group, rabbits were treated between topical itraconazole(1%, eight times daily)* and oral itraconazole [40 mg/(kg·d)]. Untreated controls were also set. The eyes were examined and photographed with a slit-lamp 1, 3, 6, 10, 15, 20 and 25 days after inoculation, and an observer graded the corneas in a masked fashion. Corneal scraping, cultures were taken on days 3, 6, 15 and 25 for fungus growth. *Results*: At the beginning of treatment, with in 1 to 3 days, the slit-lamp scores did not differ among four groups. However, after days 6 the three treated groups had statistically significant lower scores compared to the untreated controls ($P<0.01$). No significant difference was observed among 3 treated groups at any examination point. On days 15 the topical and oral & topical classes had statistically significant lower marks compared to the oral groups ($P<0.05$), but no distinguished difference was observed between topical and oral &topical groups at any examination point. On days 6, there were significantly lower positive fungal cultures and complication presence in three treatment groups compared to the controls ($P<0.05$). *Conclusion*: Our study showed that topical itraconazole were effective in lessening the severity of fungal keratitis in a rabbit model and oral ues is not necessary.

【Key words】Aspergillus fumigatus; Keratitis; Itraconazole; Treatment

真菌性角膜炎(Fungal keratitis)是一种临床较为常见眼部疾病,加上抗生素,激素以及免疫抑制剂及角膜接触镜的广泛应用,现已成为治疗棘手且致盲率较高的感染性眼病[1],主要致病菌为镰孢菌属和曲霉菌属,且排序一致,而在曲霉菌中则以烟

作者介绍:刘晓熹(1981-),男,硕士,
研究方向:白内障、角膜病。
通讯作者:李平华,男,教授,E-mail:liuxiaoxi1981@163.com。

曲霉菌占大多数。王志昕等[2]发现,镰刀菌属及曲霉菌属仍是我国主要的眼部致病真菌菌属,曲霉菌属对伊曲康唑最敏感。Kalavathy CM 等[3]发现,局部应用那他霉素治疗丝状真菌性角膜病,对曲霉菌属和弯孢菌属治疗无效时,用伊曲康唑治疗有效。虽然口服抗真菌药对于真菌性角膜炎有一定的疗效,但是其全身应用可引起严重的全身并发症[4],局部用药与全身用药的差异及联合用药方式是否有增强效应是临床上相对比较关注的问题,文献[5]对伊曲康唑局部、全身治疗实验性真菌性角膜炎的疗效都有不同的见解,但并没有将其同时用于治疗同一动物模型。故本实验选择性的选用伊曲康唑治疗其较敏感的烟曲霉菌性角膜炎模型,比较全身和局部及联合方式应用伊曲康唑的疗效,为临床上指导抗真菌药合理应用提供实验依据。对于滴眼液的制备我们严格按照 CHP2000 对眼用制剂的质量控制要求,利用调节溶液 pH 值和用羟丙基-环糊精增溶相结合的方法,制备了符合要求的 1%伊曲康唑混悬点眼剂:pH 值 7.0~7.4,稳定性好,黏度适当,渗透压偏高渗。

1 材料和方法

1.1 实验动物

32 只健康成年新西兰大白兔(雌雄不限),体重 2.0~2.5 kg(动物来源于重庆医科大学动物实验中心),实验前检查证实没有眼前节疾病。

1.2 烟曲霉菌液制备

眼科临床分离烟曲霉菌(重庆医科大学微生物教研室分离鉴定)接种于新鲜沙堡弱葡萄糖琼脂培养基,25℃温箱培养 72 h[6],生理盐水洗脱真菌孢子,红细胞计数器调整孢子浓度到 109 CFU (colony forming unit)/ml。

1.3 动物模型制作

速眠灵注射液肌肉注射 0.2 ml/kg,4%盐酸奥布卡因表面麻醉,无菌条件下直径 6 mm 角膜环钻标记于角膜中央(本实验均用右眼),刮除环钻刀沿区内上皮全层,覆盖软性角膜接触镜,1 ml 无菌注射器将 0.1 ml 备用烟曲霉菌孢子混悬液注入角膜与软性接触镜层间中央,3~0 黑色丝线暂时睑裂缝合,48 h 后拆除眼睑裂缝线,移去角膜接触镜。

1.4 处理分组

成功制备模型后(所有 32 只兔眼全部造模成功),随机分为 4 组每组 8 只,用药前双盲法行裂隙灯下临床评分 4 组间无显著性差异。口服组:伊曲康唑胶囊 40 mg/kg,bid[7,8],生理盐水溶解后灌喂;点眼组:自制 1%伊曲康唑混悬滴眼液点眼 8 次 /d,0.1 ml/ 次,每小时 1 次,均于 9:00~16:00 完成;联合组:点眼同时联合口服治疗,剂量同前两组治疗组;对照组:生理盐水点眼 8 次 /d,0.1 ml/ 次,每小时 1 次,均于 9:00~16:00 完成。

1.5 裂隙灯检查法及评分

裂隙灯显微镜照相记录并观察用药后第 1、3、6、10、15、20、25 d 的兔眼角膜病变情况,详细记录角膜病灶形态、感染范围、深度及前房反应情况,并参照 O' DAY[9]、曾庆延等[10]的方法进行临床评分。分别于第 3、6、15、25 d 刮取角膜组织行菌丝刮片、真菌培养及病理学检查。

1.6 统计分析

采用 SPSS 13.0 统计软件(Version 13.0,SPSS Inc,Chicago,Ⅲ),统计数值用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示。临床评分使用单向方差分析(ONE-WAY ANOVA)以及 Tukey HSD 检验。真菌培养阳性率以及并发症发病率则采用 Fisher's exact test 检验。

2 结 果

2.1 临床表现及评分

治疗第 3 d,4 组间临床评分没有显著性差异(P>0.05,one-way ANOVA),临床表现为:结膜充血,周边角膜水肿,中央角膜灰白混浊水肿伴有真菌浸润性生长(图 1)。第 6 d 炎症反应明显加重,结膜高度水肿充血,病灶累及大部分角膜达深层,角膜高度混浊,中央区溃疡形成伴有基质层坏死缺损,可见卫星灶、前房积脓等。真菌在角膜的中基质层生长,密度较高,形态为簇状或丛状,在接种区基质内环绕病原繁殖区周围出现大量的以多形核中性白细胞(Polymorphonucleat neutrophil,PMN)为主的炎症细胞浸润(图 5)。在 10~15 d 过程中,真菌进一步深层浸润性生长,出现化脓坏死性溃疡,基质层变薄,全层炎症细胞浸润,病灶后有浓密的斑块状渗出物(内皮斑),角膜周围新生血管向病灶区长入,前房积脓加重。在病程后期 15~25 d 阶段,对照组表现为大量新生血管长入角膜中央溃疡处,形成血管肉芽组织,血管肉芽组织由周围开始逐步取代坏死组织,但角膜中央部坏死组织进一步脱落,发生角膜穿孔,此时眼部炎症反应逐渐减轻,最后角膜完全瘢痕化修复,前房积脓无明显消退(图 2)。

与对照组相比 3 个治疗组在治疗 6、10 d 时,角膜溃疡的深度,大小以及炎症反应,结膜充血程度,角膜混浊度均有明显减轻(图 3),角膜内真菌基本消退,基质层内有炎症细胞浸润于免疫环部位;治疗 15~25 d 角膜浸润逐渐减退,角膜水肿等炎症反应逐渐消失,溃疡面逐渐愈合,角膜上皮开始修复,少量瘢痕形成(图 6),少量新生血管长入角膜缘后又逐渐消退(图 4),治疗 25 d 角膜真菌及炎症细胞浸润均消退,上皮细胞修复完整,基质层未见肉芽组织瘢痕化形成。3 个治疗组在治疗 6、10 d 临床评分显著低于对照组(表 1),且有显著性差异(P<0.01,Tukey HSD test),但 3 个治疗组之间比较没有显著性差异(P>0.05,Tukey HSD test)。治疗 15 d 后,



图 1　（接种后 3 d）结膜充血，周边角膜水肿，角膜中央真菌浸润性生长（虚箭头）

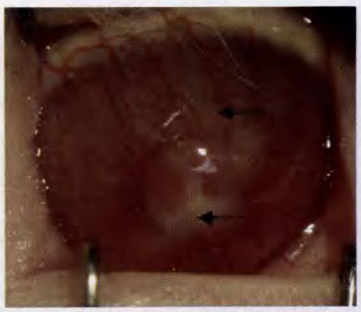


图 2　（接种后 25 d，对照组）大量新生血管长入角膜中央溃疡处（实箭头），形成血管肉芽组织，炎症反应逐渐减轻，最后角膜完全瘢痕化修复，前房积脓无明显消退（虚箭头）



图 3　（治疗 10 d，点眼组）与对照组相比角膜病变深度以及炎症反应、结膜充血、角膜浑浊均明显减轻

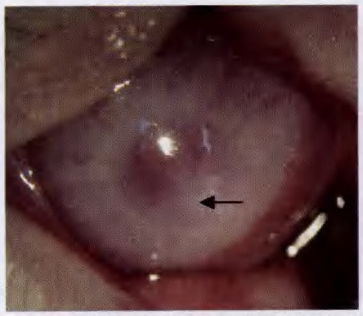


图 4　（治疗 25 d，联合组）与对照组比角膜水肿、炎症反应消失，角膜溃疡愈合，瘢痕形成（实箭头），没有新生血管长入角膜内

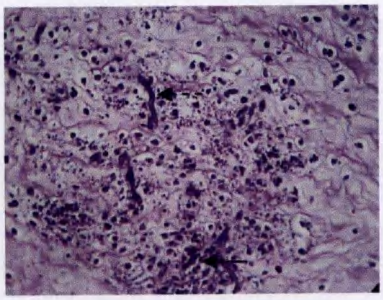


图 5　（PAS 染色，×400）角膜基质层内，大量炎症细胞（实箭头）浸润，真菌菌丝（虚箭头）扩增

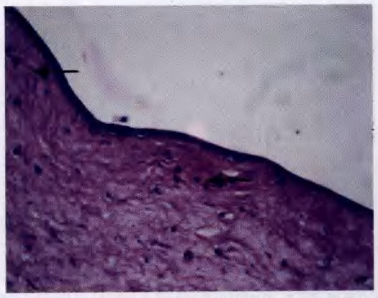


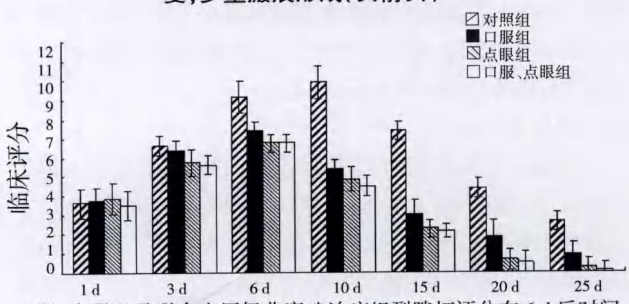
图 6　（PAS 染色，×400）角膜缺损的上皮层开始修复，少量瘢痕形成（实箭头）

3 个治疗组临床评分同样显著低于对照组（表 1），点眼组和联合组临床评分均低于口服组且有显著性差异（$P<0.05$，Tukey HSD test），但点眼组与联合组比较则没有显著性差异（$P>0.05$，Tukey HSD test）。

治疗 10 d，对照组 2 只兔眼的临床评分达到最高值，其评分平均值接近 10 分，达到所有各组各时间点的最高值。前房积脓、角膜穿孔、角膜新生血管化等并发症大多在接种后第 10~15 d 开始出现。全过程中，对照组 100%（8/8）产生前房积脓，62.5%（5/8）出现角膜穿孔，75%（6/8）角膜新生血管化。3 个治疗组 24 只兔眼中仅有 2 只角膜穿孔（口服组，点眼组各 1 只），2 只角膜新生血管化（点眼组、联合组各 1 只），并发症明显低于对照组。

2.2　真菌病原培养结果

治疗第 3 d 角膜组织刮片真菌培养均为阳性，阳性标本经玻片培养法鉴定均为原始接种的烟曲霉菌菌株。治疗第



口服、点眼以及联合应用伊曲康唑治疗组裂隙灯评分在 6 d 后时间点内明显低于对照组

表 1　组间临床评分平均值在 1，3，6，10，15，20，25 d 不同的时间点之间的比较

6 d 取角膜组织培养，8 只眼培养阳性，其中对照组 6 只（72.5%），口服组 1 只（12.5%），点眼组 0 只（0%），联合组 1 只（12.5%）。3 个治疗组真菌阳性培养率明显低于对照组阳性培养率（$P=0.041$，$P=0.007$，$P=0.041$，Fisher's exact test）。第 15、25 d 刮取的角膜组织真菌培养均为阴性。

3 讨 论

伊曲康唑的抑菌活性是抑制真菌 CYP450 酶 -14a 去甲基酶。这种酶在真菌膜的一种组分—麦角固醇的合成中起重要作用。伊曲康唑作用于 14a- 去甲基酶,产生下列效果:(1)麦角固醇含量下降,于麦角固醇残生有关的化合物如 14- 甲基化固醇和 3- 酮类固醇堆积,细胞膜变得稳定。(2)麦角固醇的减少使得几丁质合成失调,几丁质是酵母隔膜和菌丝壁的重要组分。(3)类固醇结构的变化改变了脂肪酸的沉积,从而显著改变膜结合酶的活性。使膜的构造、机能发生相应的改变。与 P450 结合同时阻止了细胞色数 C 在线粒体膜上分解氧化酶的功能,从而导致胞内过氧化氢浓度的升高,细胞内器的变化和死亡。损伤的细胞对渗透破坏敏感,继之被宿主白细胞吞噬。

此种药物抗真菌作用强、毒副作用小,其氮原子与哺乳类动物细胞色素 P450 的结合较弱,而对真菌的 P450 则有高度亲和力。其全身用药的毒副作用包括胃肠道反应,如消化不良、恶心、呕吐、腹泻和便秘。此外尚有头痛、眩晕、外周水肿、月经失调、可逆性肝酶增高和变态反应(皮肤、瘙痒、丘疹、荨麻疹、血管神经性水肿)。偶有心力衰竭、肝功能衰竭、低血钾、高甘油三酯血症、粒细胞减少、脱发、外周神经病等。此药副作用小,毒性低,不良反应发生率为 2.4% ~ 17.7%[4],停药后转氨酶迅速降为正常。

良好的动物模型对真菌性角膜炎的研究至关重要,怎样制备一种更符合临床感染的动物模型,是现目前研究的重点也是难点。目前国际上通用的真菌性角膜炎的动物模型是板层注射法致深层真菌性角膜感染的模型[11],但此类动物模型已严重破坏了角膜板层结构,并且需要联合结膜下注射糖皮质激素以增进菌丝对角膜的穿透[12],不符合真菌性角膜炎的自然病程。模型制备的成功与真菌的接种浓度和角膜免疫功能状态有关,但最重要的因素是真菌与角膜细胞之间能否保持有效的粘附,有关配戴角膜接触镜易引起真菌性角膜炎的临床报道[13]也从一个侧面佐证了角膜接触镜的上述作用。我们所采用的角膜接触镜法使真菌与角膜密切的粘附对高效的模型成功率起到了关键性作用。

Thomas F 等[7]在研究伊曲康唑口服溶液治疗侵袭性曲霉菌病时发现,口服 20 mg/kg 以及 40 mg/kg 与对照组相比,均能提高实验动物的生存率,但是 40 mg/kg 的剂量不仅可以提高生存率减低抗原水平,还能明显抑制真菌在组织内的生长。对侵袭性起霉菌病有良好的疗效。O'Day DM 等研究发现,对于治疗实验性曲霉菌性角膜炎 40 mg/kg,bid 伊曲康唑在造模成功后有显著疗效,且口服与局部点眼均能使房水及角膜内的伊曲康唑含量超过烟曲霉菌的最小抑菌浓度[8,14]。

现目前临床真菌性角膜炎的治疗主要是以经验性治疗为主, 治疗药物的选择一般不会等待到药敏试验的结果后,加上真菌性角膜炎的临床体征变异很大,并没有规范化的诊断治疗方案,多以局部与全身联合使用广谱抗真菌药物以达到期望的疗效。但联合治疗是否确实有增强药物抗真菌的疗效,目前还没有明确的定论。文献[15]报道以真菌的敏感性和临床用药相结合加以判断,但眼科方面的研究还十分有限。我们的试验选择伊曲康唑点眼(0.1%,8 次/d)与口服(40 mg/kg,bid)对于治疗兔实验性烟曲霉菌性角膜炎均获得良好的疗效,有效地减少临床评分,阳性培养率及并发症发生率,均显著下降。但在 15 d 后发现,点眼组和联合组临床评分均低于口服组。可能是由于局部频繁应用增加药物在局部的含量,且药物直接作用于有创的溃疡表面,直接渗透达组织内部,作用更确切。全身用药靶向性相对降低,药物到达局部的浓度也相对较低,只有通过加大口服药物剂量得以改善,但药物副作用则有很可能会伴随口服剂量增大而增大[4]。全身联合局部应用则与局部应用没有显著性差异,并没有联合增强的作用。因此,从本试验结果来看,曲霉菌性角膜炎的治疗应以局部用药为主,全身用药并非必须。

参 考 文 献

[1] 马 林,谢立信.角膜致病真菌的流行病学[J].中国实用眼科杂志,2006,24(4):352-356.

[2] 王志昕,王智群,罗时运,等.眼部真菌感染的病原学及体外药物敏感性分析[J].眼科研究,2007,25(2):145-148.

[3] Kalavathy C M, Parmar P, Kaliamurthy J, et al. Comparison of topical itraconazole 1% with topical natamycin 5% for the treatment of filamentous fungal keratitis [J]. Cornea, 2005, 24(4): 449-452.

[4] 居 靖,屈 建.FDA 对伊曲康唑和特比萘芬的安全性提出警告[J].中国新药杂志,2002,11(4):314-316.

[5] Maertens J, Boogaerts M. The place for itraconazole in treatment [J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 56(1s): 33-38.

[6] Meletiadis J, Meis J F, Mouton J W, et al. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media [J]. Clin Microbiol, 2001, 39(4): 478-484.

[7] Thomas F, Annetle W, Michael G. Efficacy of itraconazole solution in a rabbit model of invasive aspergillosis[J]. Antimicroblal Agents and Chemotherapy, 1993, 37(11): 2307-2310.

[8] O'Day D M, Head W S, Robinson R D, et al. The evaluation of therapeutic responses in experimental keratomycosis [J]. Curr Eye Res, 1992, 11(1): 35-44.

[9] O'Day D M, Head W S, Csank C, et al. Differences in virulence between two candida albicans strains in experimental keratitis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(2): 1116-1121.

[10] 曾庆延,董晓光,史伟云,等.真菌孢子勃附和基质金属蛋白酶在角膜真菌感染中的作用[J].中华眼科杂志,2004,40(6):774-776.

[11] Wolfram S, Antje O, Christian K V, et al, Combined topical fluconazole and corticosteroid treatment for experimental candida albicans keratomycosis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(6): 2634-2643.

[12] Kiryu H, Ycehida S, Suenaga Y, et al. Invasion and survival of Fusaritma solani in the dexamethasone treated Cornea of rabbits[J]. J Meel Vet Mycol, 1998, 29(6): 395-406.

[13] Ritterband D C, Seedor J, Shah M, et al. A unique case of cryptococcus laurentii keratitis spread by a rigid gas permeable contact lens in a patient with onychomycosis[J].Cornea, 1998, 11(3): 115-117.

[14] 朱 军,魏开芳,丁瑞芳,等.HPLC 法测定房水中伊曲康唑的含量[J].济宁医学院学报,2006,29(2): 36-37.

[15] Lalitha P, Shapiro B L, Srinivasan M, et al. Antimicrobial susceptibility of Fusarium, Aspergillus, and other filamentous fungi isolated from keratitis[J]. Arch Ophthalmol, 2007, 125(6): 789-793.

(责任编辑:冉明会)