

· 实验研究 ·

## 角膜胶原交联治疗小鼠真菌性角膜炎的疗效

朱子芊 邱双浩 岳娟 刘素素 顾丽哲 张红敏 李志杰 王丽娅

450003 郑州,河南省人民医院 郑州大学人民医院 河南省眼科研究所 河南省立眼科医院  
(朱子芊、邱双浩、岳娟、刘素素、张红敏、王丽娅);121001 锦州医科大学(顾丽哲);510632 广州,暨南大学医学院眼科研究所 暨南大学再生医学教育部重点实验室(李志杰)

通信作者:王丽娅,Email:wangliya\_55@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.05.005

**【摘要】目的** 研究角膜胶原交联术(CXL)在治疗真菌性角膜炎过程中的疗效。 **方法** 选择 6~8 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 80 只,制作腐皮镰孢菌性角膜炎模型,其中 40 只用于角膜真菌活性的检测,40 只用于疗效观察,均以左眼为实验眼。角膜真菌活性的检测中将 40 只小鼠按照随机数字表法分为假手术组(不接种菌丝)、模型对照组、去上皮组(造模后刮除角膜上皮)和交联治疗组(去上皮联合交联治疗),各组小鼠分别于造模后 3 d 用裂隙灯显微镜对术眼角膜炎症进行评分,并行角膜组织的载菌量计数。交联疗效观察实验中,应用随机数字表法将 40 只小鼠随机分为假手术组(不接种菌丝)、模型对照组、去上皮组和交联治疗组(去上皮联合交联治疗)。4 个组小鼠分别于造模后连续 7 d 行裂隙灯显微镜下术眼角膜炎症评分及眼前节数码照相。造模后 14 d,裂隙灯显微镜下对术眼角膜炎症单项评分后,行组织病理学检查及炎症细胞计数。

**结果** 造模后交联治疗组小鼠角膜载菌量最低,各组角膜载菌量的总体比较,差异有统计学意义( $F=11.97$ , $P=0.00$ ),交联治疗组角膜载菌量平板计数与角膜炎症评分呈明显正相关( $r=0.723$ , $P=0.043$ )。交联治疗组各时间点小鼠的角膜炎症评分明显低于模型对照组,3 个组间和不同时间点角膜炎症评分的总体比较,差异均有统计学意义( $F_{\text{分组}}=34.44$ , $P=0.00$ ;  $F_{\text{时间}}=17.49$ , $P=0.00$ )。造模后 14 d,去上皮组和交联治疗组小鼠角膜病灶面积和溃疡程度评分均明显低于模型对照组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。角膜组织病理学检查显示,模型对照组小鼠角膜水肿,部分角膜基质溶解坏死,去上皮组于造模后角膜炎症表现较轻。交联治疗组小鼠角膜炎症反应最轻微,造模后 7 d 角膜炎症接近痊愈。假手术组角膜基质内细胞很少;模型对照组基质增厚,基质内炎症细胞增多,可以确认的中性粒细胞占基质所有细胞总数的 73.65%;去上皮组中性粒细胞百分比为 59.33%;交联治疗组中性粒细胞百分比为 11.29%。**结论** CXL 可以有效抑制小鼠角膜真菌活性,减轻真菌诱导的角膜炎症反应。

**【关键词】** 抗真菌治疗; 角膜胶原交联; 真菌性角膜炎; 小鼠

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81670827); 河南省科技攻关计划项目(152102410085); 郑州市人才队伍建设计划-科技创新团队项目(131PCXTD620)

**Antifungal efficacy of corneal collagen cross-linking on treating experimentally induced fungal keratitis of mice** Zhu Ziqian, Qiu Shuanghao, Yue Juan, Liu Susu, Gu Lizhe, Zhang Hongmin, Li Zhijie, Wang Liya

*Henan Eye Institute, Henan Eye Hospital, Henan Provincial People's Hospital, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China (Zhu ZQ, Qiu SH, Yue J, Liu SS, Zhang HM, Wang LY); Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China (Gu LZ); Key Laboratory of Regenerative Medicine, Ministry of Education, Jinan University, Institute of Ophthalmology, Guangzhou 510632, China (Li ZJ)*

**Corresponding author:** Wang Liya, Email: wangliya\_55@126.com

**[Abstract]** **Objective** This study was to assess the efficacy of corneal collagen cross-linking treatment on fungal keratitis. **Methods** Eighty SPF male C57BL/6 mice aged 6–8 weeks were selected for the experiment. *Fusarium solani* infected model was established on the left eyes of all 80 mice. Forty mice were distributed randomly into sham operation group, model control group, scraped epithelium group and corneal collagen cross-linking (CXL) group (treated with epithelium scraped and CXL). Three days after modeling, the levels of the corneal disease severity were scored by slit lamp microscopy. The fungal activity was confirmed by plate counts. The left 40 mice were divided randomly into sham operation group, model control group, scraped epithelium group and CXL group (treated with epithelium scraped and CXL). In 1 day and 2,3,4,5,6,7,14 days after modeling, the corneas were examined under the slit lamp microscope. The corneal pathological examination of each group were conducted with hematoxylin and eosin staining at postoperative 14 days. The animal feeding and use was in accordance with the standards set by the ARVO, and the experiment was approved by the Ethic Committee for Experimental Animal of Henan Eye Institute.

**Results** The colony-forming units (CFUs) of fungal solutions in culture significantly decreased with CXL treatment

( $F = 11.97, P = 0.00$ )。The Pearson correlation analysis of CFU and clinical scores in CXL group showed that inflammatory cells infiltration was positively correlated with corneal disease severity ( $r = 0.723, P = 0.043$ )。Corneal inflammatory score was significantly lower in the CXL group in various time points, with a significant differences among the groups and time points ( $F_{group} = 34.44, P = 0.00; F_{time} = 17.49, P = 0.00$ )。Corneal lesion and the depth of ulceration in scraped epithelium group and CXL group were remarkably lower than that in the model control group (all at  $P < 0.05$ )。Histopathology revealed that the degree of corneal collagen fibers destruction and the ratio of inflammatory cells infiltration in scraped epithelium group (59.33%) and CXL group (11.29%) were much lower than that in the model control group (73.65%)。Conclusions CXL can inhibit the fungal activity effectively in the cornea of mice, and reduce the fungal induced keratitis reaction。

[Key words] Antifungal therapeutic use; Corneal collagen cross-linking; Fungal keratitis; Mice

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China Grants (81670827); Henan Province Science and Technology Research Project (152102410085); Zhengzhou City Project for Science and Technology Talents Team Construction Plan Science and Technology Innovation Team (131PCXTD620)

真菌性角膜炎是一种严重的致盲眼病,多由丝状真菌引起,常见于发展中国家,尤其是中国和印度,近年来其发病率已上升至感染性角膜病的首位<sup>[1-2]</sup>。由于缺乏高效、广谱的抗真菌剂,药物的治疗效果差强人意<sup>[3-5]</sup>。15%~27%的患者常因治疗失败或晚期并发症出现需要手术治疗,而中国角膜材料的匮乏使得治疗颇为棘手<sup>[6]</sup>。因此,迫切寻求一种更好的治疗方式以便更为有效地控制感染过程。角膜胶原交联术(corneal collagen cross-linking, CXL)由 Wollensak 在 2003 年提出,首先用于圆锥角膜的治疗,随后逐渐用于多种感染性角膜病的治疗,更是细菌性角膜炎的一线治疗措施<sup>[7-9]</sup>。然而 CXL 对真菌性角膜炎治疗的有效性仍有争议<sup>[10-12]</sup>。本研究通过观察 CXL 对小鼠真菌性角膜炎的炎症反应和组织学的影响,探讨 CXL 对小鼠真菌性角膜炎疗效的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 8~10 周龄健康雄性 C57BL/6 小鼠 80 只(南京大学模式动物研究所提供),体质量为 24~27 g,均在 SPF 动物房饲养和实验。动物的饲养与使用均遵照 ARVO 制定的科研动物使用规范,均遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物质量管理办法》要求。本研究经河南省眼科研究所实验动物伦理委员会审核批准。

**1.1.2 实验用真菌标准菌株** 腐皮镰刀菌(3.1791)标准菌株(北京中国科学院微生物研究所中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心)。按照标准方法进行复苏和传代,取生长良好的真菌用于实验。

**1.1.3 主要试剂及仪器** 质量分数 0.1% 核黄素磷酸钠溶液(俄罗斯科学院乌法眼病研究所);戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司);盐酸丁卡因滴眼液(日本参天制药有限公司)。UV-360 型角膜交联仪(光腾科技厦门有限

公司);OMS-90 型体视解剖显微镜(日本 Topcon 公司);HRT3 海德堡视网膜激光断层扫描系统(德国 Heidelberg 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 真菌性角膜炎模型的建立** 小鼠腹腔内注射戊巴比妥钠 0.016 ml/g 行全身麻醉,用 10 g/L 盐酸丁卡因滴眼液点眼行角膜表面麻醉。参照文献[13]所述进行真菌性角膜炎模型制作,用无菌手术刀在小鼠角膜中央 2 mm 环钻区域内做十字划痕,此过程切勿损伤角膜基质层。取与腐皮镰刀菌共培养 3~7 d 带有腐皮镰刀菌的竹签,尖端在小鼠眼部创面涂抹真菌进行眼部真菌感染。真菌接种后 18 h,活体激光扫描共焦显微镜下有菌丝生长者为真菌性角膜炎模型制作成功。

**1.2.2 实验动物的分组及处理** 40 只小鼠用于角膜真菌活性的检测,40 只小鼠用于疗效观察。应用随机数字表法将各 40 只小鼠随机分为假手术组(同真菌性角膜炎模型制作,不种植真菌)、模型对照组、去上皮组和交联治疗组(去上皮联合交联治疗)。小鼠腹腔内注射戊巴比妥钠 0.016 ml/g 行全身麻醉,在去上皮组和交联治疗组小鼠角膜中央,用高尔夫样刀刮除 2 mm 环钻区域的病灶部位角膜上皮。交联治疗组小鼠每隔 5 min 滴加 1 次 0.1% 核黄素磷酸钠溶液 5 μl 至角膜表面,持续 30 min,在裂隙灯显微镜钴蓝光照射下可见周边基质和房水黄染时确认为紫外线照射前核黄素已经进入前房;将小鼠角膜暴露于波长为 370 nm、能量为 45 mW/cm<sup>2</sup> 的紫外光下照射 2 min,光斑直径控制为角膜病灶直径,其余各组不给予角膜交联处理。

**1.2.3 各组小鼠角膜载菌量计数** 各组小鼠于造模后 3 d 裂隙灯显微镜下观察术眼和眼前节数码照相后,颈椎脱臼法处死各组小鼠,将感染的角膜组织在质量分数 0.85% 无菌生理盐水中研磨至肉眼看不见组

组织块为止,转入15 ml离心管后以9 000 r/min离心10 min,收集上清液,参照文献[14]均匀涂布于PDA培养基,铺板后置于25 ℃培养箱内48 h,计数真菌菌落个数。

**1.2.4 各组小鼠角膜病灶的裂隙灯显微镜观察及炎症反应评分** 各组小鼠于造模后1、2、3、4、5、6和7 d进行裂隙灯显微镜下术眼观察和眼前节数码照相,参照Schreiber评分系统<sup>[15]</sup>进行角膜病变严重程度评分。造模后14 d,参照Karti等<sup>[16]</sup>的方法进行病灶面积、混浊度、水肿程度、上皮新生血管、角膜溃疡程度分级并进行改良。病灶面积分级:健康角膜为0分;病灶面积占角膜总面积的1%~25%为1分;病灶面积占角膜总面积的26%~50%为2分;病灶面积占角膜总面积的51%~75%为3分;病灶面积占角膜总面积的76%~100%为4分。角膜混浊度分级:角膜透明为0分;角膜呈现轻度雾状混浊,瞳孔虹膜结构清晰可见为1分;角膜浅层混浊,透过病灶可见瞳孔及虹膜为2分;角膜全层呈不均匀混浊为3分;角膜全层呈均匀致密混浊为4分。角膜水肿分为0~2级:角膜无水肿为0分;角膜中度水肿为1分;角膜明显水肿为2分。新生血管生成分级:角膜边缘无新生血管为0分;新生血管占角膜总面积的1%~25%为1分;新生血管占角膜总面积的26%~50%为2分;新生血管占角膜总面积的51%~75%为3分;新生血管占角膜总面积的76%~100%为4分。角膜溃疡分级:角膜无溃疡为0分;角膜浅层溃疡为1分;角膜深层溃疡为2分;角膜后弹力膜膨出为3分;角膜穿孔为4分。

**1.2.5 各组小鼠角膜切片的组织病理学检查** 造模后14 d,无菌条件下摘取各组小鼠左侧眼球,在解剖显微镜下剪取角膜,置于质量分数4%中性甲醛溶液中固定、脱水、石蜡包埋后在角膜中央以矢状位做5 μm厚切片。二甲苯脱蜡,苏木精-伊红染色,封片后光学显微镜下进行组织病理学检查。各组每个角膜各选2张切片进行中性粒细胞计数,于角膜中央病灶区任意选取3个视野,角膜边缘任意选取2个视野。每个细胞核按1个细胞计数,典型的分叶状细胞核记作中性粒细胞,计算典型的中性粒细胞占所有基质内细胞总数的比例,进行中性粒细胞密度分级<sup>[17]</sup>:仅浸润到基质前部为1级;浸润到基质中部为2级;浸润基质全层为3级。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0统计学软件进行统计分析。各组小鼠角膜载菌量、角膜炎症评分以及各组小鼠角膜炎症转归评分经W检验证实呈正态分布,均以 $\bar{x}\pm s$ 表

示。各组角膜载菌量计数组间方差经Levene检验证实方差齐,各组角膜载菌量计数比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-t检验。真菌性角膜炎病变角膜的炎症反应评分与角膜载菌量的关系评价采用Pearson相关分析,并对相关系数进行假设检验。各组不同时间点角膜炎症评分比较采用重复测量两因素方差分析,两两比较采用Tamhane T2检验。各组角膜各项炎症转归评分经Levene检验证实方差不齐,各组小鼠角膜组织炎症转归评分采用Kruskal-Wallis检验,两两比较采用Wilcoxon秩和检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠角膜内真菌活性检测

模型对照组、去上皮组和交联治疗组小鼠角膜载菌量计数总体比较,差异有统计学意义( $F=11.97, P=0.00$ ),其中去上皮组和交联治疗组均较模型对照组减少,交联治疗组角膜内活性真菌量最少,与模型对照组比较差异均有统计学意义( $t=3.45, P<0.01; t=4.73, P<0.01$ )(表1)。

表1 各组小鼠角膜载菌量计数比较( $\bar{x}\pm s$ , CFU)

组别	样本量	角膜载菌量计数
模型对照组	10	98.20±20.93
去上皮组	10	53.40±38.44 <sup>a</sup>
交联治疗组	10	36.80±24.76 <sup>a</sup>
F值		11.97
P值		0.00

注:与模型对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ (单因素方差分析,LSD-t检验)  
CFU:菌落形成单位

### 2.2 交联治疗组角膜炎症反应评分和角膜载菌量的相关关系

Pearson相关分析结果显示,交联治疗组角膜载菌量与角膜病变严重程度呈明显正相关( $r=0.723, P=0.043$ )(图1)。

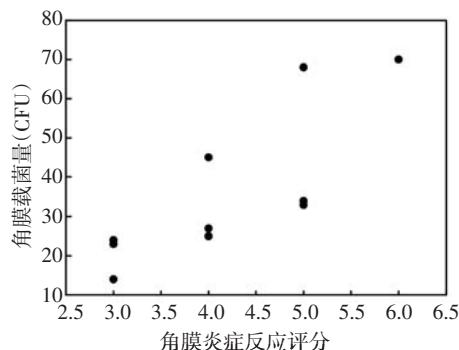


图1 交联治疗组角膜载菌量与角膜炎症评分关系  
角膜载菌量与角膜炎症评分呈明显正相关( $r=0.723, P=0.043$ )(Pearson相关分析, $n=10$ )  
CFU:菌落形成单位

### 2.3 各组小鼠角膜真菌性角膜炎模型表现

裂隙灯显微镜下观察可见,假手术组造模后1 d,角膜中央部位可见极轻微混浊,随时间延长角膜混浊程度减轻、范围缩小,1 d后恢复正常。模型对照组以及去上皮组和交联治疗组均出现真菌性角膜炎表现,接种后18 h角膜出现毛玻璃样水肿,角膜基质浸润,病变进展较为迅速,大多出现典型的菌丝苔被,部分可见免疫环和卫星灶。与假手术组相比,模型对照组、去上皮组和交联治疗组各时间点角膜炎症反应评分均升高,说明造模成功。各组不同时间点角膜炎症反应评分总体比较,差异均有统计学意义( $F_{\text{分组}} = 34.44, P = 0.00$ ;  $F_{\text{时间}} = 17.49, P = 0.00$ )。早期各组角膜均呈现随造模时间延长炎症评分增加的趋势,病变范围逐渐扩大,角膜水肿加重,混浊加深。造模后3 d模型对照组病变明显

加重,部分角膜出现前房积脓;造模后4 d,交联治疗组炎症反应达高峰,评分为(7.00±2.16)分。造模后5 d,模型对照组角膜炎症反应达高峰,评分为(13.50±5.89)分,去上皮组小鼠角膜炎症评分升高至(11.20±6.34)分,模型对照组小鼠角膜炎症评分明显高于去上皮组和交联治疗组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。造模5 d后病变逐渐减轻,去上皮组角膜病灶范围逐渐缩小,角膜水肿减轻;交联治疗组治疗后病变范围得到控制,浸润范围显著缩小,在相应时间点炎症反应更轻微(图2)。造模后7 d,模型对照组小鼠角膜炎症评分稍有下降,去上皮组和交联治疗组明显下降,其中交联治疗组较去上皮组和模型对照组角膜炎症评分下降,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )(表2)。

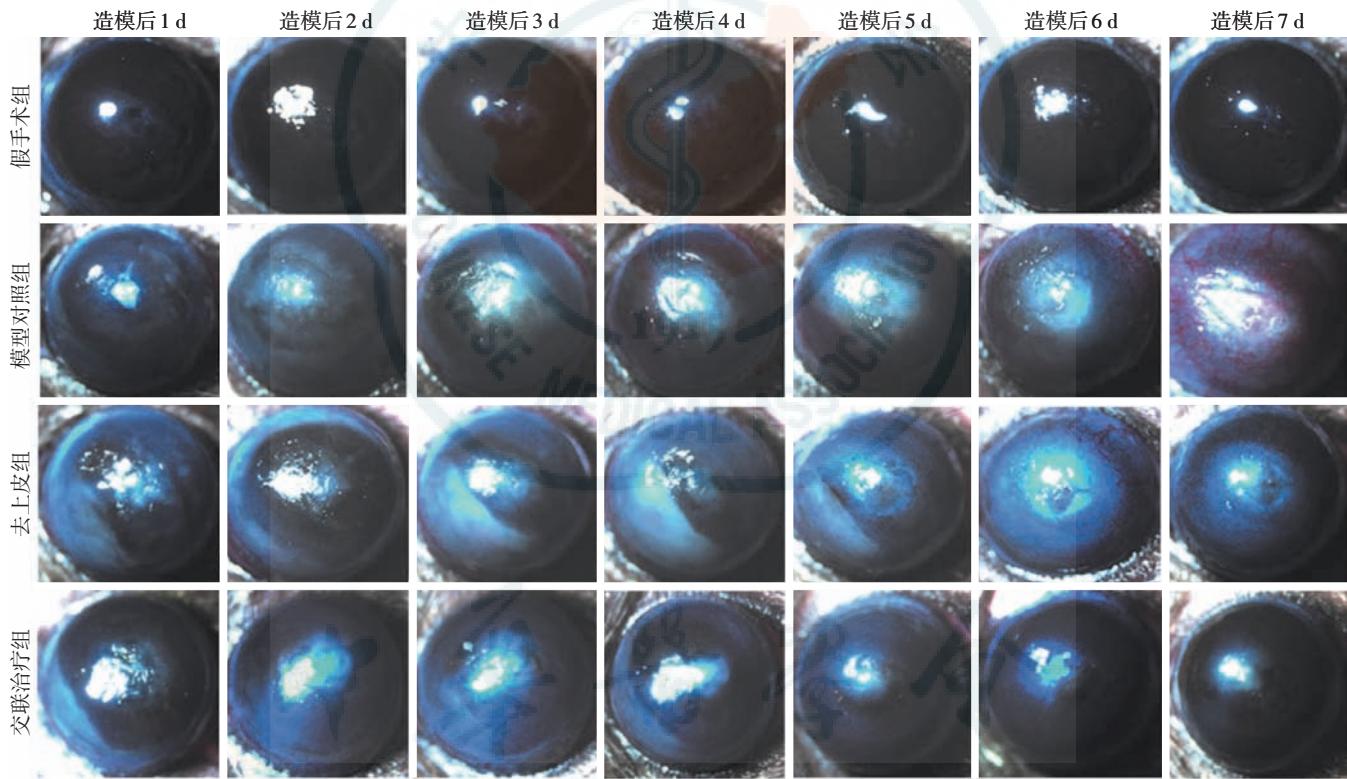


图2 各组小鼠裂隙灯显微镜下角膜炎症表现 模型对照组随造模时间的延长,角膜病变严重程度逐渐加重;去上皮组病灶浸润程度轻于模型对照组;交联治疗组角膜病变程度低于其他各组

表2 各组不同时间点角膜炎症评分比较( $\bar{x} \pm s$ , 分)

组别	样本量	不同时间点角膜炎症评分						
		造模后1 d	造模后2 d	造模后3 d	造模后4 d	造模后5 d	造模后6 d	造模后7 d
假手术组	10	0.50±0.71	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型对照组	10	4.10±0.42 <sup>a</sup>	7.80±1.48 <sup>a</sup>	7.90±0.74 <sup>a</sup>	12.30±4.55 <sup>a</sup>	13.50±5.89 <sup>a</sup>	12.90±6.69 <sup>a</sup>	10.60±7.81 <sup>a</sup>
去上皮组	10	3.50±0.70 <sup>a</sup>	7.40±1.17 <sup>a</sup>	7.80±1.37 <sup>a</sup>	10.90±6.47 <sup>a</sup>	11.20±6.34 <sup>a</sup>	10.70±5.74 <sup>a</sup>	6.70±6.40 <sup>ab</sup>
交联治疗组	10	3.40±1.07 <sup>a</sup>	6.10±1.37 <sup>abc</sup>	6.20±1.55 <sup>abc</sup>	7.00±2.16 <sup>abc</sup>	6.60±2.50 <sup>abd</sup>	5.10±2.08 <sup>abd</sup>	2.80±1.32 <sup>abd</sup>

注: $F_{\text{分组}} = 34.44, P = 0.00$ ;  $F_{\text{时间}} = 17.49, P = 0.00$ 。与假手术组相比,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与各自模型对照组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与去上皮组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.01$ (重复测量两因素方差分析,Tamhane T2 检验)

## 2.4 各组小鼠角膜炎症转归评分的比较

各组小鼠角膜病灶面积、角膜溃疡程度评分比较，差异均有统计学意义( $H=6.826, P=0.033$ ;  $H=6.845, P=0.033$ )，其中去上皮组和交联治疗组小鼠角膜病灶面积较模型对照组显著减小，且交联治疗组角膜病灶面积较去上皮组小，差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )；模型对照组有小鼠出现角膜穿孔，去上皮组小鼠角膜溃疡度较模型对照组明显减轻，差异有统计学意义( $P<0.05$ )，且未见小鼠角膜穿孔，交联治疗组未见角膜溃疡。各组小鼠角膜混浊度、角膜水肿程度、新生血管评分总体比较差异均无统计学意义( $H=2.499, P=0.294$ ;  $H=2.522, P=0.283$ ;  $H=2.720, P=0.257$ ) (表3)。

表3 各组小鼠角膜炎症转归评分( $\bar{x}\pm s$ , 分)

组别	样本量	角膜病灶面积	角膜溃疡程度	角膜混浊度	角膜水肿程度	角膜新生血管
模型对照组	10	2.20±1.32	2.00±2.11	2.30±1.34	0.10±0.32	1.90±1.59
去上皮组	10	1.70±0.67 <sup>a</sup>	0.80±1.69 <sup>a</sup>	1.80±1.32	0.40±0.52	1.10±0.87
交联治疗组	10	1.10±0.32 <sup>ab</sup>	0.00±0.00 <sup>ab</sup>	1.40±0.70	0.20±0.42	0.80±1.03
<i>H</i> 值		6.826	6.845	2.449	2.522	2.720
<i>P</i> 值		0.033	0.033	0.294	0.283	0.257

注：与各自的模型对照组相比，<sup>a</sup> $P<0.05$ ；与各自的去上皮组比较，<sup>b</sup> $P<0.05$ (Kruskal-Wallis 检验,Wilcoxon 秩和检验)

## 2.5 各组小鼠角膜组织病理学检查

模型对照组、去上皮组和交联治疗组与假手术组相比，各时间点角膜炎症细胞数均明显增多。假手术组角膜基质内细胞很少，模型对照组炎症细胞浸润波及角膜全层，浸润程度为3级，且基质增厚，可以确认的中性粒细胞占基质所有细胞总数的73.65%；去上皮组小鼠角膜水肿，角膜上皮细胞不规则，角膜基质纤维破坏严重，基质内大量炎性细胞浸润达深基质层，浸润程度为2级，可以确认的中性粒细胞占基质所有细胞总数的59.33%；交联治疗组小鼠角膜水肿、基质溶解明显轻于模型对照组和去上皮组，浸润程度为1级，中性粒细胞占基质细胞百分比约为11.29% (图3,4)。

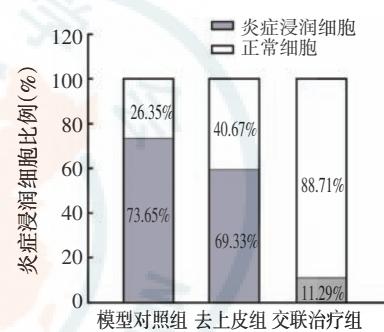


图3 各组小鼠角膜组织内炎症浸润细胞的比例 (%)  
模型对照组小鼠角膜炎症浸润明显加重；去上皮组角膜病灶炎症程度轻于模型对照组；交联治疗组角膜内炎症细胞最少

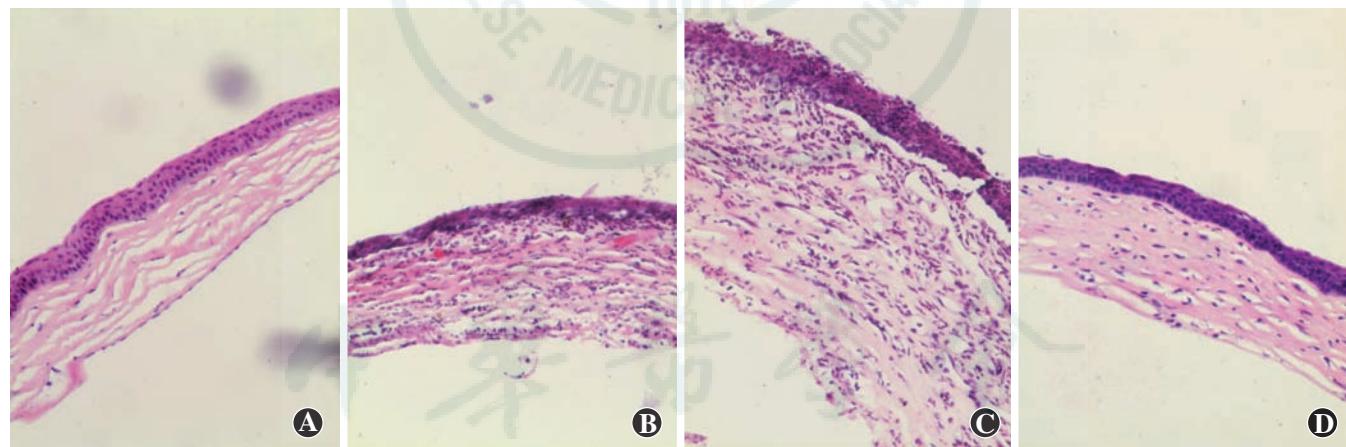


图4 各组小鼠角膜组织病理学表现(HE  $\times 400$ ) 模型对照组小鼠角膜组织破坏最为严重，去上皮组次之，交联治疗组角膜病变程度最轻  
A:假手术组 B:模型对照组 C:去上皮组 D:交联治疗组

## 3 讨论

本研究中采用C57BL/6小鼠模拟人角膜真菌自然感染的方式成功地建立了动物模型，评估了CXL对真菌性角膜炎的转归过程，结果发现交联治疗组各项恢复指标显著优于不治疗组，这些结果提示CXL具有用于控制人真菌性角膜炎病程进展的潜在能力。

本研究发现，交联治疗组小鼠角膜载菌量减少，角膜基质层胶原纤维的结构加强，角膜抗水肿能力增强，

角膜胶原的消化被抑制，角膜溃疡进展延缓，小鼠各项炎症转归均好于模型对照组。

一些实验室研究和临床研究也证实了CXL对真菌性角膜炎有很好的治疗作用<sup>[18-19]</sup>，如Hao等<sup>[18]</sup>用CXL联合两性霉素治疗兔真菌性角膜溃疡，发现CXL可以减少角膜胶原纤维的破坏和角膜组织中炎症细胞的浸润，终止了角膜的溶解。Iseli等<sup>[20]</sup>对5例抗生素强化治疗无效的真菌性角膜炎患者实施CXL治疗，发现术后角膜溶解受到抑制。Panda等<sup>[21]</sup>对真菌性角膜

炎进行 CXL 治疗,发现术后角膜溃疡好转,无需再次手术治疗。Li 等<sup>[22]</sup>对 8 例真菌性角膜炎患者行 CXL 治疗,术后感染被抑制和溃疡愈合,改善了预后。Hafezi 等<sup>[11]</sup>对耐药性真菌性角膜溃疡进行 CXL 治疗后,发现病情好转。迄今为止,多数临床研究是以回顾性和小规模的方式进行 CXL 的机制研究。一般认为 CXL 对真菌性角膜炎的治疗作用与下列因素有关:(1)紫外线对微生物的直接灭活作用<sup>[19]</sup>;(2)核黄素作为一种光化学介质,本身无毒性<sup>[23]</sup>,有研究表明核黄素虽不能灭活真菌,但可以诱导真菌细胞壁组分结构的构象变化<sup>[24]</sup>,表现为丝状细胞衰老,细胞体积减小,细胞毒力增加<sup>[25]</sup>;(3)光化学作用中产生的氧自由基可以损伤病原微生物的核酸,有直接的细胞毒性<sup>[26-27]</sup>;(4)CXL 可以使角膜胶原纤维交联,提高角膜机械硬度,增加角膜基质的生物力学稳定性,降低菌丝向组织深处的穿透作用,对抗微生物病原体酶的消化作用增强,减轻角膜溶解<sup>[7,28-29]</sup>。此外,刮除角膜上皮,清除了一些角膜组织内部生长的菌丝,胶原交联杀灭残留菌丝,进一步抑制菌丝的生长。

然而关于 CXL 对真菌性角膜炎疗效的研究仍有争议<sup>[18,20-22]</sup>,一些研究结果与本研究结果相悖。Vajpayee 等<sup>[30]</sup>对 41 例真菌性角膜炎患者进行分组治疗,发现 CXL 治疗和 CXL 联合真菌药物组术后的恢复状况无明显差异,认为 CXL 联合药物治疗并未提高患者的治愈率。Richoz 等<sup>[31]</sup>研究发现,对于抗真菌性药物治疗没有好转的深基质真菌性角膜炎患者,交联治疗组比对照组穿孔率更高。据此本研究推测,临床治疗多在晚期药物治疗无效的情况下试验性地进行 CXL,前期药物治疗可能对交联的治疗有影响,且后期角膜组织严重损伤,晚期治疗降低胶原交联的有效性。本研究认为,CXL 术后大部分浅层真菌性角膜炎感染被控制,但是随着角膜炎病情的加重,菌丝浸润程度的增加,治愈率有所降低,分析其原因可能与丝状真菌种类、种间生物学行为和对治疗的敏感性不同有关<sup>[32-33]</sup>。例如,腐皮镰刀菌多平行于板层缓慢生长,早期仅见于表层,角膜浸润较浅,刮除角膜上皮可以清除角膜组织内部生长的菌丝<sup>[34]</sup>。与深层感染不同,CXL 可更有效地杀灭和抑制浅层菌丝,所以 CXL 可对浅层真菌性角膜炎具有更好的疗效。深层角膜炎的菌丝不仅可侵入角膜深基质层,而且还可以引起剧烈的炎症反应,导致角膜溶解和穿孔,甚至发生继发性前房积脓<sup>[35-36]</sup>。因此,单纯一次性 CXL 很难完全杀灭位于深基质的菌丝,从而延长治疗过程。所以,本研究认为,对于浅层角膜病变应及时行 CXL,对于深层角膜

炎患者可考虑实施多次 CXL 治疗。

综上所述,本研究证实了 CXL 对真菌性角膜炎的有效性,但仍有一定的局限性,如本研究未与药物的治疗效果进行比较,未测量眼压。未来仍需要扩大样本量,设立更多实验动物组别,观察更长时间,并对细胞和分子机制进行深入研究。

## 参考文献

- Wang L, Sun S, Jing Y, et al. Spectrum of fungal keratitis in central China [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2009, 37 (8) : 763-771. DOI: 10.1111/j.1442-9071.2009.02155.x.
- Öz Y, Özdemir HG, Gökbolat E, et al. Time-kill kinetics and *in vitro* antifungal susceptibility of non-fumigatus aspergillus species isolated from patients with ocular mycoses [J]. Mycopathologia, 2016, 181 (3-4) : 225-233. DOI: 10.1007/s11046-015-9969-z.
- Alexandrakis G, Jalali S, Gloor P. Diagnosis of *Fusarium* keratitis in an animal model using the polymerase chain reaction [J]. Br J Ophthalmol, 1998, 82 (3) : 306-311.
- Dócz I, Gyettai T, Kredics L, et al. Involvement of *Fusarium* spp. in fungal keratitis [J]. Clin Microbiol Infect, 2004, 10 (9) : 773-776.
- Galperin G, Berra M, Tau J, et al. Treatment of fungal keratitis from *Fusarium* infection by corneal cross-linking [J]. Cornea, 2012, 31 (2) : 176-180. DOI: 10.1097/ICO.0b013e318221cec7.
- Vemuganti GK, Garg P, Gopinathan U, et al. Evaluation of agent and host factors in progression of mycotic keratitis: a histologic and microbiologic study of 167 corneal buttons [J]. Ophthalmology, 2002, 109 (8) : 1538-1546.
- Wollensak G, Spörle E, Seiler T. Treatment of keratoconus by collagen cross linking [J]. Ophthalmologe, 2003, 100 (1) : 44-49. DOI: 10.1007/s00347-002-0700-3.
- Chan TC, Agarwal T, Vajpayee RB, et al. Cross-linking for microbial keratitis [J]. Curr Opin Ophthalmol, 2016, 27 (4) : 348-352. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000271.
- Skaat A, Zadok D, Goldich Y, et al. Riboflavin/UVA photochemical therapy for severe infectious keratitis [J]. Eur J Ophthalmol, 2014, 24 (1) : 21-28. DOI: 10.5301/ejo.5000330.
- Hafezi F, Dejica P, Majo F. Modified corneal collagen crosslinking reduces corneal oedema and diurnal visual fluctuations in Fuchs dystrophy [J]. Br J Ophthalmol, 2010, 94 (5) : 660-661. DOI: 10.1136/bjo.2009.162479.
- Hafez MI. Evaluation of the therapeutic effect of corneal collagen cross-linking in the treatment of resistant corneal ulcer [J]. J Egypt Ophthalmol Society, 2014, 107 (3) : 187-190.
- Richoz O, Moore J, Hafezi F, et al. Corneal cross-linking as an adjuvant therapy in the management of recalcitrant deep stromal fungal keratitis: a randomized trial [J]. Am J Ophthalmol, 2015, 160 (3) : 616-617. DOI: 10.1016/j.ajo.2015.06.014.
- 张红敏, 刘素素, 陈国铭, 等. 中性粒细胞在不同品系正常小鼠角膜的分布及其与角膜创伤修复的关系 [J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32 (9) : 780-785. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.09.003.
- Zhang HM, Liu SS, Chen GM, et al. Distribution trait of neutrophils in corneas of different strains of normal mice and their effects on corneal wound healing [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32 (9) : 780-785. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.09.003.
- Choi KS, Yoon SC, Rim TH, et al. Effect of voriconazole and ultraviolet-A combination therapy compared to voriconazole single treatment on *Fusarium solani* fungal keratitis [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2014, 30 (5) : 381-386. DOI: 10.1089/jop.2013.0167.
- Ozturk F, Yavas GF, Kusbeci T, et al. Efficacy of topical caspofungin in experimental *Fusarium* keratitis [J]. Cornea, 2007, 26 (6) : 726-728. DOI: 10.1097/ICO.0b013e3180553b9d.
- Kartti O, Zengin MO, Cinar E, et al. Effect of 1- and 6-hour-delayed corneal collagen cross-linking on corneal healing in a rabbit alkali-burn model: clinical and histological observations [J]. Cornea, 2016, 35 (12) :

- 1644–1649. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001050.
- [17] Kitamura K, Farber JM, Kelsall BL. CCR6 marks regulatory T cells as a colon-tropic, IL-10-producing phenotype [J]. *J Immunol*, 2010, 185(6) : 3295–3304. DOI: 10.4049/jimmunol.1001156.
- [18] Hao ZQ, Song JX, Pan SY, et al. Corneal collagen cross-linking and liposomal amphotericin B combination therapy for fungal keratitis in rabbits [J]. *Int J Ophthalmol*, 2016, 9(11) : 1549–1554. DOI: 10.1824/ijo.2016.11.03.
- [19] Tonnetti L, Proctor MC, Reddy HL, et al. Evaluation of the Mirasol platelet reduction technology system against *Babesia microti* in apheresis platelets and plasma [J]. *Transfusion*, 2010, 50(5) : 1019–1027. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02538.x.
- [20] Iseli HP, Thiel MA, Hafezi F, et al. Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts [J]. *Cornea*, 2008, 27(5) : 590–594. DOI: 10.1097/ICO.0b013e318169d698.
- [21] Panda A, Krishna SN, Kumar S. Photo-activated riboflavin therapy of refractory corneal ulcers [J]. *Cornea*, 2012, 31(10) : 1210–1213. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31823f48.
- [22] Li Z, Jhanji V, Tao X, et al. Riboflavin/ultraviolet light-mediated crosslinking for fungal keratitis [J]. *Br J Ophthalmol*, 2013, 97(5) : 669–671. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2012-302518.
- [23] Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue [J]. *Exp Eye Res*, 1998, 66(1) : 97–103. DOI: 10.1006/exer.1997.0410.
- [24] Bartnicki-Garcia S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1968, 22 : 87–108. DOI: 10.1146/annurev.mi.22.100168.000511.
- [25] Cornforth JW, Ryback G, Robinson PM, et al. Isolation and characterization of a fungal vacuolation factor (bikaverin) [J]. *J Chem Soc Perkin 1*, 1971, 16 : 2786–2788.
- [26] Maisch T, Baier J, Franz B, et al. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(17) : 7223–7228. DOI: 10.1073/pnas.0611328104.
- [27] Tsugita A, Okada Y, Uehara K. Photosensitized inactivation of ribonucleic acids in the presence of riboflavin [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1965, 103(2) : 360–363.
- [28] Wang T, Peng Y, Shen N, et al. Photochemical activation increases the porcine corneal stiffness and resistance to collagenase digestion [J]. *Exp Eye Res*, 2014, 123 : 97–104. DOI: 10.1016/j.exer.2014.04.008.
- [29] Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion [J]. *Curr Eye Res*, 2004, 29(1) : 35–40. DOI: 10.1080/02713680490513182.
- [30] Vajpayee RB, Shafiq SN, Maharana PK, et al. Evaluation of corneal collagen cross-linking as an additional therapy in mycotic keratitis [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2015, 43(2) : 103–107. DOI: 10.1111/ceo.12399.
- [31] Richoz O, Moore J, Hafezi F, et al. Corneal cross-linking as an adjuvant therapy in the management of recalcitrant deep stromal fungal keratitis: a randomized trial [J]. *Am J Ophthalmol*, 2015, 160(3) : 616–617. DOI: 10.1016/j.ajo.2015.06.014.
- [32] Thomas PA. Mycotic keratitis—an underestimated mycosis [J]. *J Med Vet Mycol*, 1994, 32(4) : 235–256.
- [33] Kuzucu C, Rapino B, McDermott L, et al. Comparison of the semisolid agar antifungal susceptibility test with the NCCLS M38-P broth microdilution test for screening of filamentous fungi [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(3) : 1224–1227.
- [34] Xie L, Zhai H, Shi W, et al. Hyphal growth patterns and recurrence of fungal keratitis after lamellar keratoplasty [J]. *Ophthalmology*, 2008, 115(6) : 983–987. DOI: 10.1016/j.ophtha.2007.07.034.
- [35] Mahdy RA, Nada WM, Wageh MM. Topical amphotericin B and subconjunctival injection of fluconazole (combination therapy) versus topical amphotericin B (monotherapy) in treatment of keratomycosis [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2010, 26(3) : 281–285. DOI: 10.1089/jop.2010.0005.
- [36] Prajna NV, Mascarenhas J, Krishnan T, et al. Comparison of natamycin and voriconazole for the treatment of fungal keratitis [J]. *Arch Ophthalmol*, 2010, 128(6) : 672–678. DOI: 10.1001/archophthalmol.2010.102.

(收稿日期:2017-12-19 修回日期:2018-01-20)

(本文编辑:刘艳)

## 读者·作者·编者

### 本刊对中英文摘要的要求

论著或综述文稿正文请撰写中英文摘要。原创性论著文稿要求为结构式摘要,包括背景(Background)、目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusions)5个要素,摘要能够回答以下问题:(1)为什么进行这项研究。(2)主要用什么方法进行研究。(3)获得什么主要结果。(4)通过研究得出什么结论等。其中背景部分请概括本课题所涉及的研究内容及亟待解决的问题。目的部分为本课题对上述提出问题设立的目标。方法部分应提供研究对象、样本量、分组情况、各组的干预情况、与研究相适应的观察或检测指标,获得结局指标的手段和设备等。临床研究请说明是前瞻性研究、回顾性研究还是观察性研究。结果部分请客观描述研究的主要发现,包括主要的形态学检查表现、相关的关键性或主要的量化资料以及相应的统计学比较结果,须写明统计学量值及其概率值。结论部分请提出与本研究论据直接相关的、必然的推论,避免得出过度推测性、评价性和扩大化的结论。摘要请用第三人称客观表述,不列图表,不引用文献,不加评论和解释。英文摘要应与中文摘要内容相对应,但为了对外交流的需要,可以略详细。英文摘要应包括论文文题(正体)及全部作者姓名(汉语拼音,姓在前,首字母大写,名在后,首字母大写,双字连写。如:Yin Xiaohui)、标准化的单位名称、城市名称(汉语拼音)、邮政编码及国家名称(全部为斜体)。并请在另起一行处提供通信作者姓名的汉语拼音和Email地址,如Corresponding author:Yin Xiaohui, Email: xiaohuix@126.com。专家述评或综述类文稿请撰写指示性中英文摘要,摘要内容应包含研究涉及的概念、研究的目的、综述资料的来源、复习的文献量、研究的新发现或应用领域、综合的结果和结论及其意义等必要的信息。

研究论文为前瞻性研究者应在中英文摘要结束处提供临床试验注册号,以“临床试验注册(Trial registration)”为标题,提供注册机构名称和注册号。前瞻性临床研究的论著摘要应注明遵循 CONSORT 声明(Consolidated Standards of Reporting Trials)(<http://www.consort-standart.org/home>)。

(本刊编辑部)