

兔铜绿假单胞菌性角膜感染后炎症失控反应发病机制及治疗研究

梁庆丰 李彬 张阳 Labbe Antoine

100730 北京,首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科研究所
北京市眼科学与视觉科学重点实验室

通信作者:李彬,Email:libin43_99@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.02.007

【摘要】 背景 感染性角膜炎是中国常见的致盲眼病,临床上常见炎症失控反应的发生,其发病机制及治疗方法尚不明确。目的 研究兔角膜铜绿假单胞菌性感染炎症失控反应的临床表现和发生机制,探讨多西环素对兔角膜炎症失控反应的治疗作用。方法 选取 60 只 1 月龄新西兰白兔,采用铜绿假单胞菌液兔右眼角膜基质内注射法感染动物角膜,采用加替沙星滴眼液频繁点眼 3 d 后,选取 42 只角膜炎症不能缓解或加重的眼作为角膜炎症失控反应动物模型。采用抽签法将模型眼随机分为加替沙星点眼组(15 眼)、联合点眼组(加替联合多西环素点眼组,15 眼)和平衡盐溶液(BSS)对照组(12 眼),分别于分组后第 1 天用相应溶液点眼,1 次/2 h,每日 8 次,连续用药 14 d。裂隙灯显微镜下观察各组兔眼点眼后 1、3、7 和 14 d 的眼部表现并进行炎症评分,计算角膜浸润面积;在上述各时间点获取各组兔眼角膜组织,采用常规组织病理学检查观察兔角膜组织的炎症细胞浸润情况;采用免疫组织化学法检测各组角膜组织中基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和 MMP-9 的表达;采用 ELISA 法测定各组角膜匀浆中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素 1 β (IL-1 β)质量浓度的变化。结果 加替沙星点眼组和联合点眼组兔眼点眼后 7 d 眼部炎症评分明显低于点眼前,角膜浸润面积明显较点眼前缩小,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);点眼后 7 d,加替沙星点眼组和联合点眼组眼部炎症评分明显低于 BSS 对照组,角膜浸润面积明显小于 BSS 对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。组织病理学研究表明,联合点眼组兔眼点眼后 14 d,角膜组织中炎症细胞浸润明显少于点眼后 5 d,可见角膜胶原纤维增生和重新排列。免疫组织化学染色显示,联合点眼组点眼后 5 d 可见角膜组织中 MMP-2、MMP-9 呈强阳性表达,随着点眼时间延长其表达强度减弱,点眼后 14 d 角膜组织中 MMP-2、MMP-9 表达量明显低于点眼后 5 d 和 BSS 对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。ELISA 测定显示,点眼后 5 d,联合点眼组兔眼角膜组织中 TNF- α 及 IL-1 β 质量浓度明显低于 BSS 对照组,差异有统计学意义($P = 0.00, 0.03$),点眼后 14 d 角膜中 TNF- α 及 IL-1 β 质量浓度明显低于点眼后 5 d 和 7 d,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 采用铜绿假单胞菌角膜基质内注射并用加替沙星滴眼液频繁点眼法可成功建立角膜炎症失控反应动物模型。多西环素点眼可抑制炎症失控反应模型眼角膜中促炎因子及 MMPs 的释放,从而促进角膜组织的修复,对感染性角膜炎症失控反应损伤发挥治疗作用。

【关键词】 角膜感染; 细菌; 铜绿假单胞菌; 抗菌药物; 炎症失控; 角膜炎/药物治疗; 多西环素; 动物模型; 兔

基金项目: 国家自然科学基金项目(81470607);北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养基金(2014-3-016)

Pathogenesis and treatment of overwhelming inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in rabbit Liang Qingfeng, Li Bin, Zhang Yang, Labbe Antoine

Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Lab, Beijing 100730, China

Corresponding author: Li Bin, Email: libin43_99@163.com

[Abstract] **Background** Infectious keratitis is common blinding eye disease in China. Inflammatory runaway reaction often occurs in infectious keratitis, and its mechanism and treating approach are worthy of research.

Objective This study was to investigate the clinical manifestation, mechanism and treatment outcome of doxycycline in overwhelming inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. **Methods** *Pseudomonas aeruginosa* suspension was intrastromal injected in 60 right eyes of 60 New Zealand white rabbits, and gatifloxacin eye drops was frequent instilled for consecutive 3 days to establish corneal inflammatory runaway reaction models, and 42 eyes with

worse keratitis were defined as overwhelming inflammation. Then the models were randomly divided into gatifloxacin treatment group (15 rabbits), combined treatment group (gatifloxacin with doxycycline treatment, 15 rabbits) and balance salt solution (BSS) control group (12 rabbits), and corresponding eye drops was topically administered in the rabbits 8 times per day for 14 days. The symptoms of the models were observed under the slit lamp microscope on day 1, 3, 7 and 14 after treatment, and the corneal infiltration area was calculated. The corneal morphology was examined by using hematoxylin-eosin staining. The expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in the corneal tissue were examined by immunohistochemistry. The contents of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in corneal homogenate were detected by ELISA. The use and care of the animals complied with the ARVO Statement. **Results** The inflammatory scores were lower and infiltration area of cornea was smaller 7 days after treatment than those before treatment in the combined treatment group and gatifloxacin treatment group (both at $P < 0.05$). Hematoxylin-eosin staining result showed that the inflammation response of cornea subsided 14 days in comparison with 5 days after treatment in the combined treatment group, with the proliferation and rearrangement of fibrous tissue. The MMP-2 and MMP-9 were strongly expressed in corneal tissue with overwhelming inflammation in day 5 after treatment, however, the expression intensity weakened in 14 days after treatment in the combined treatment, showing significant differences in the absorbance between them (all at $P < 0.05$). ELISA assay showed that the contents of TNF- α and IL-1 β in corneal tissue were significantly lower in the combined treatment group than those in the BSS group ($P = 0.00, 0.03$). In addition, contents of TNF- α and IL-1 β in corneal tissue were significantly declined at day 14 in comparison with day 5 and day 7 after treatment in the combined treatment group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Overwhelming inflammatory keratitis models can be successfully established by corneal intrastromal injection of *Pseudomonas aeruginosa* suspension and immediately frequent 3-day instillation of gatifloxacin eye drops in rabbits. The topical application of doxycycline plays treating effect on overwhelming inflammatory keratitis by inhibiting the release of pro-inflammatory cytokines and MMPs.

[Key words] Infectious eye disease, corneal; Bacteria; *Pseudomonas aeruginosa*; Antibacterial agents; Overwhelming inflammation; Keratitis/drug therapy; Doxycycline; Disease models, animal; Rabbits

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81470607); Foundation for High-level Talents in Beijing Health Bureau (2014-3-016)

感染性角膜炎是眼科的多发病,常严重损害眼组织结构及视功能,目前仍是发展中国家致盲的重要原因之一^[1]。近年来经过大量感染性角膜病诊疗的基础研究及临床实践,我们已逐步建立了标准化的感染性角膜炎的实验室诊断方法,同时随着抗菌药物的不断更新及抗生素滴眼液局部应用方法的推广,大部分眼表病原微生物能在较短时间内得到清除^[2-3]。然而由病原体激发的角膜炎反应却可长期存在,对角膜及眼内组织造成极大损害,如角膜溶解、角膜溃疡不愈合甚至穿孔等,临床上称此为失控性炎症反应^[4]。所以,治疗感染性角膜炎不应局限于控制感染及对症支持疗法,而阻断或减轻过度炎症反应导致的自身组织损害及防止角膜组织的进一步损伤将为角膜感染的治疗提供有效途径。目前,关于失控性炎症反应的相关研究正逐渐引起关注。本研究通过制备兔铜绿假单胞菌角膜炎失控反应模型,明确角膜炎失控反应的临床表现及发生机制,探讨多西环素对角膜炎症失控反应的治疗作用,为感染性角膜炎的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病原菌 铜绿假单胞菌菌株(ATCC27853)由

北京市眼科研究所分离后低温保存,解冻后接种于普通血平皿培养基,置于 37 °C 温箱中进行培养 24 ~ 48 h,菌落生长后转种。用无菌生理盐水冲刷菌落,将菌落制备至 1.0 麦氏单位(McFarland standard),然后再用无菌生理盐水稀释为 1×10^6 菌落形成单位/ml(colony forming units/ml, CFU/ml),无菌 EP 管分装,置 4 °C 冰箱保存 24 h 以上。

1.1.2 实验动物 普通级 1 月龄新西兰白兔 60 只(购自北京医学实验动物中心),雌雄不限,体质量 2.0 ~ 2.5 kg。所有实验动物行常规眼科检查,排除眼部疾患。实验动物的使用和喂养遵循 ARVO 声明,经北京同仁医院实验动物伦理委员会批准。

1.1.3 主要试剂及仪器 注射用盐酸多西环素粉(国药准字 H20060405,海南通用康力公司);盐酸地塞米松注射液(郑州卓峰制药有限公司);盐酸奥布卡因滴眼液(日本参天制药株式会社);盐酸氯胺酮注射液(江苏恒瑞医药股份有限公司);吉姆萨染色剂、革兰染色剂(北京天星普信生物医药有限公司);ELISA 试剂盒(上海希美生物科技有限公司);鼠抗兔肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 一抗(T3198-500UG)、鼠抗兔白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 一抗(YJ-0812R)、鼠抗兔基质金属蛋白酶-2 (matrix

metalloproteinase-2, MMP-2) 一抗 (sc-34014)、鼠抗兔 MMP-9 一抗 (sc-21733) (上海希美生物科技公司)。SLM-3 裂隙灯显微镜 (日本 Topcon 公司)。

1.2 方法

1.2.1 盐酸多西环素滴眼液的制备 在无菌通风橱中取注射用盐酸多西环素粉 0.2 g, 用 10 ml 灭菌注射用水溶解至 20 mg/ml, 配制成质量分数 2% 盐酸多西环素滴眼液, 分装于 2 个消毒眼瓶中, 4 °C 避光保存备用。

1.2.2 动物模型的制备 本研究均选择实验兔右眼制备角膜炎症失控反应模型, 参照文献 [5-6] 的方法, 于造模前 3 d 右眼结膜下注射盐酸地塞米松注射液 2 mg (0.4 ml)。造模时以 44 mg/kg 盐酸氯胺酮注射液和 5 mg/kg 安定注射液经肌内注射进行全身麻醉, 用质量分数 0.4% 盐酸奥布卡因滴眼液点眼行表面麻醉。无菌条件下用 8.5 mm 角膜环钻在右眼角膜颞上方钻切角膜, 深度为 1/3 角膜厚度, 沿切痕用 1 ml 一次性注射器向兔角膜基质层内注入铜绿假单胞菌菌液 0.2 ml, 菌液扩散后形成直径 3~4 mm 的层间混浊。术毕用阿托品眼膏涂眼。

1.2.3 实验动物分组与治疗 自造模后第 1 天开始, 所有动物均用 0.3% 加替沙星滴眼液点眼, 1 次/h, 点眼 3 d 后参照参考文献 [7] 的方法对模型眼的症状进行综合评分, 包括结膜充血、结膜分泌物及角膜混浊情况。结膜充血评分标准: 结膜无充血者为 0 分; 充血局限于穹窿部、血管呈鲜红色者为 1 分; 充血明显达部分睑裂部结膜、血管充血呈深红色者为 2 分; 整个结膜弥漫性充血、血管充血呈紫红色者为 3 分。结膜分泌物评分标准: 结膜囊无分泌物者为 0 分; 结膜囊少许分泌物, 呈淡黄色、液态状者为 1 分; 中等量分泌物, 呈黄色、粘稠状者为 2 分; 整个结膜结膜囊大量黄色粘稠分泌物、上下眼睑黏着者为 3 分。角膜混浊评分标准: 角膜透明者为 0 分; 角膜透明度减低, 但可见虹膜纹理者为 1 分; 中度角膜灰白混浊, 但可见瞳孔者为 2 分; 整个角膜完全混浊, 呈白色, 完全不能透视瞳孔者为 3 分。通过 SLM-3 裂隙灯显微镜的计算机软件分析角膜基质浸润程度及浸润面积。按照文献 [8] 的标准定义角膜炎症失控反应, 即角膜浸润范围 $\geq 6 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$, 表面溃疡范围 $\geq 4 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ 。采用抽签法将符合角膜炎症失控反应标准的 42 只动物模型眼随机分为 3 个组, 其中加替沙星治疗组 15 只, 单纯使用加替沙星滴眼液点眼, 1 次/2h, 8 次/d; 联合治疗组 15 只, 使用加替沙星滴眼液 1 次/2h, 每日 8 次, 多西环素滴眼液每月 3 次, 2 种滴眼液点眼间隔 5 min; 平衡盐溶液 (balanced salt solution, BSS) 对照组 12 只, 单纯使用

BSS 滴眼液 1 次/2h, 每日 8 次。分组后即刻开始点眼, 所有药物每次 2 滴, 连续使用 14 d。

1.2.4 模型眼眼部症状观察

1.2.4.1 裂隙灯显微镜检查 各组兔眼分别于用药后 1、3、7 和 14 d 进行裂隙灯显微镜检查, 按照 1.2.3 的方法根据兔眼结膜充血、结膜分泌物及角膜混浊等各组眼眼部症状进行综合评分。

1.2.4.2 角膜病灶刮片镜检 分别于用药前及用药后 3 d、7 d、14 d, 采用角膜病灶刮片法采集标本, 进行吉姆萨和革兰染色, 记录刮片染色阳性例数。

1.2.4.3 角膜病灶细菌的定量培养 加替沙星点眼组和联合点眼组实验动物分别于用药后 5、7 和 14 d 采用静脉空气栓塞法各处死 5 只; BSS 对照组在点眼后 0、5、7 和 14 d 各处死 3 只。无菌条件下用 10 mm 环钻钻取角膜平分为 2 片, 一半用于组织病理学和免疫化学检查, 另一半用于 ELISA 检测。将角膜组织在装有 1 ml 生理盐水的组织研磨器中粉碎并研磨成匀浆, 离心半径为 10 cm, 1 000 r/min 离心 5 min, 取离心沉淀物置于无菌试管中, 加生理盐水至 10 ml, 分别稀释 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 倍, 吸取不同稀释度的悬液各 1 ml 接种至普通血平皿培养基中, 37 °C 孵育 24 d, 记录 CFU。记录前取少许菌落涂片行革兰染色, 确定为铜绿假单胞菌。

1.2.5 ELISA 法测定角膜匀浆中 TNF- α 、IL-1 β 质量浓度 取 1.2.4.3 部分离心上清液, ELISA 法测定 TNF- α 及 IL-1 β 质量浓度。参照试剂盒方法建立标准曲线, 样品孔中各加入角膜匀浆样品 100 μl ; 37 °C 孵育 2 h; 用洗涤液充分洗板, 甩去液体后, 滤纸吸干, 然后加入 TNF- α 或 IL-1 β 一抗工作液 (稀释比例 1:1 000) 每孔 50 μl , 轻敲, 使得液体充分混匀, 37 °C 孵育 1 h; 用洗涤液充分洗板, 甩去液体后, 滤纸吸干, 加入二抗 (稀释比例 1:10 000) 每孔 100 μl , 轻敲使得液体充分混匀; 37 °C 孵育 1 h; 充分洗板, 甩去液体后, 滤纸吸干; 加入底物工作液每孔 100 μl , 37 °C 避光反应 8 min; 加入终止液每孔 50 μl ; 采用赛默飞酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司) 于波长为 490 nm 处测定吸光度 (A) 值。根据标准曲线计算各组样品中 TNF- α 和 IL-1 β 质量浓度。

1.2.6 角膜组织病理学观察 将角膜组织置于体积分数 10% 甲醛溶液中固定, 制备组织切片, 梯度乙醇脱水, 浸蜡, 包埋, 自中央角膜开始连续切片, 行常规苏木精-伊红染色, 光学显微镜下计数角膜中炎症细胞的种类和数量。

1.2.7 免疫组织化学法检测角膜中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达 取角膜切片, 常规脱蜡, 体积分数 3% H_2O_2 室温孵育 10 min, 蒸馏水洗 3 遍; 微波抗原修复后

滴加胰酶消化液(1:3 稀释) 37 ℃ 温箱消化修复 10 min; 分别滴加鼠抗兔 TNF- α 一抗、鼠抗兔 IL-1 β 一抗、鼠抗兔 MMP-2 和鼠抗兔 MMP-9 一抗, 4 ℃ 过夜, 滴加生物素化羊抗鼠 IgG, 37 ℃ 温箱孵育 20 min, 滴加 SABC, 室温孵育 20 min; DAB 室温显色。以 0.01 mol/L 的 PBS 代替一抗作为阴性对照, 光学显微镜下观察, 每组切片在高倍镜($\times 400$)下任意选取 4 个相邻视野在相同条件下照相, 采用 CMIAS 系列多功能真彩色病理图像分析系统计算阳性染色的吸光度(A)值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验证实符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用随机分组多水平实验设计, BSS 组、加替沙星点眼组和联合点眼组模型眼在点眼后不同时间点的眼部炎症评分、角膜浸润面积、角膜组织中 MMP-2 和 MMP-9 表达量(A 值)及角膜组织匀浆中 TNF- α 和 IL-1 β 质量浓度的总体差异比较均采用两因素方差分析, 多重比较采用 pos-HOC 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组动物造模后眼部症状

在角膜基质内注射接种铜绿假单胞菌 1 d 后, 60 眼均出现结膜充血、结膜囊大量黄绿色黏脓性分泌物、角膜水肿、角膜混浊等症状, 角膜病灶刮片及吉姆萨染色可见大量杆菌存在。加替沙星滴眼液点眼后 3 d, 18 眼结膜充血减轻, 角膜浸润范围缩小, 炎症得到控制, 另有 42 眼症状未缓解或加重, 成功建立失控性炎症反应模型。加替沙星点眼组和联合点眼组随着点眼时间的延长, 结膜分泌物逐渐减少, 结膜充血及角膜混浊逐渐减轻, 角膜浸润面积及角膜溃疡范围逐渐缩小(图 1~2)。BSS 对照组、加替沙星点眼组和联合点眼组间兔眼症状评分的总体比较差异有统计学意义($F=21.180, P=0.023$), 点眼后 7 d 加替沙星点眼组和联合点眼组的眼症状评分均明显低于 BSS 对照组, 差异均有统计学意义($t=3.492, 4.128, 均 P<0.05$); 各组点眼前后眼部

症状评分的总体比较差异有统计学意义($F=59.520, P=0.011$), 其中加替沙星点眼组和联合点眼组点眼后 7 d 与点眼前比较眼部症状评分均明显降低, 差异均有统计学意义($t=-2.642, -3.141, 均 P<0.05$)。BSS 对照组、加替沙星点眼组和联合点眼组间角膜浸润面积的总体比较差异有统计学意义($F=20.130, P=0.031$), 点眼后 7 d 加替沙星点眼组和联合点眼组的角膜浸润面积均明显小于 BSS 对照组, 差异均有统计学意义($t=3.234, 4.346, 均 P<0.05$); 各组点眼前后角膜浸润面积的总体比较差异有统计学意义($F=18.290, P=0.038$), 其中加替沙星点眼组和联合

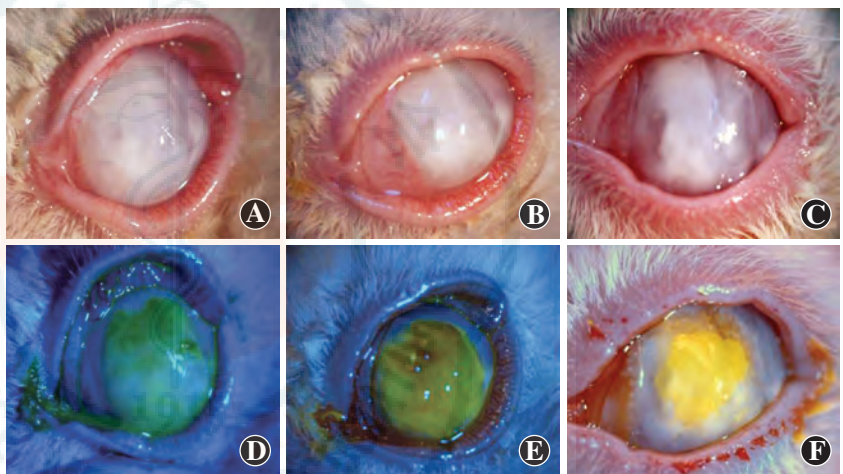


图 1 加替沙星点眼组不同治疗时间点裂隙灯显微镜下表现 A: 点眼后 5 d 角膜弥漫照可见全角膜灰白致密浸润和脓疡 B: 点眼后 7 d 角膜弥漫照可见角膜浸润程度及脓疡范围略缩小 C: 点眼后 14 d 角膜弥漫照可见角膜浸润程度明显减轻, 脓疡范围缩小 D: 点眼后 5 d 角膜钴蓝像可见全角膜溃疡 E: 点眼后 7 d 角膜钴蓝像可见角膜溃疡较前略缩小 F: 点眼后 14 d 角膜钴蓝像可见角膜溃疡缩小仅 1/3

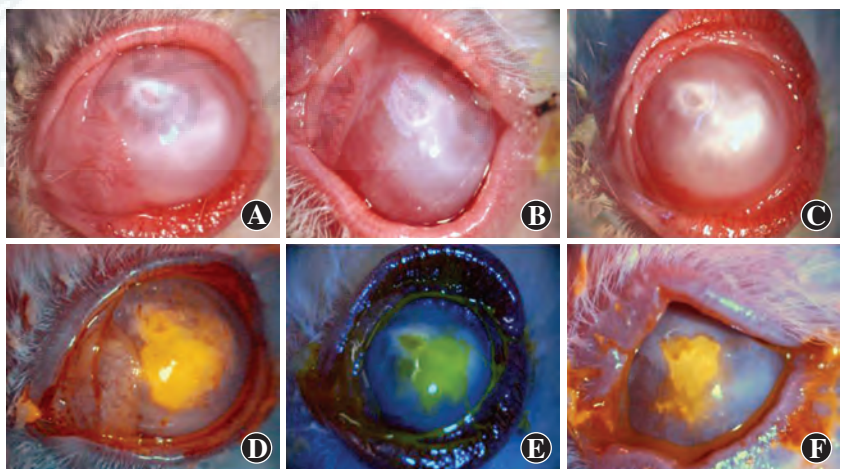


图 2 联合点眼组不同治疗时间点裂隙灯显微镜下表现 A: 点眼后 5 d 角膜弥漫照可见角膜白色致密浸润病灶 B: 点眼后 7 d 角膜弥漫照可见浸润程度减轻 C: 点眼后 14 d 角膜弥漫照可见颞下方浸润病灶部分吸收 D: 点眼后 5 d 角膜钴蓝像可见角膜中央溃疡 E: 滴眼后 7 d 角膜钴蓝像可见角膜中央溃疡缩小 F: 点眼后 14 d 角膜钴蓝像可见角膜溃疡明显缩小

点眼组点眼后 7 d 与点眼前比较,角膜浸润面积均明显缩小,差异均有统计学意义 ($t = -2.222, -3.788$, 均 $P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组兔眼点眼前后眼症状评分和浸润面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	眼症状评分		角膜浸润面积 (mm ²)	
		点眼前	点眼后 7 d	点眼前	点眼后 7 d
BSS 对照组	6	10.71 ± 1.59	9.42 ± 1.14	17.41 ± 2.65	16.87 ± 3.49
加替沙星点眼组	10	10.29 ± 1.59	7.29 ± 1.59 ^{ab}	18.88 ± 1.99	15.97 ± 2.02 ^{ab}
联合点眼组	10	10.29 ± 1.59	6.87 ± 1.47 ^{ab}	18.63 ± 2.72	15.05 ± 3.80 ^{ab}

注: 症状评分: $F_{\text{分组}} = 21.180, P = 0.023; F_{\text{时间}} = 32.560, P = 0.002$. 浸润面积: $F_{\text{分组}} = 20.130, P = 0.031; F_{\text{时间}} = 28.650, P = 0.021$. 与各自的 BSS 对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与各自组内点眼前比较, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, post-HOC 检验) BSS: 平衡盐溶液

2.2 各组兔眼角膜培养细菌数量的变化

BSS 对照组、加替沙星点眼组和联合点眼组随着点眼时间的延长,角膜中细菌数量逐渐下降,不同时间点总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{时间}} = 51.790, P = 0.001$),其中各组兔眼点眼后 7 d 和 14 d 细菌菌落数较点眼后 5 d 均明显减少,点眼后 14 d,加替沙星点眼组和联合点眼组细菌菌落数均明显少于组内点眼后 7 d,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。3 个组间角膜病灶培养后细菌数量总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 34.750, P = 0.002$),其中加替沙星点眼组和联合点眼组点眼后 5、7、14 d 角膜病灶细菌菌落数明显低于 BSS 对照组,联合点眼组兔眼点眼后 7 d 和 14 d,角膜病灶细菌菌落数明显少于加替沙星点眼组,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (表 2)。

表 2 各组实验兔角膜细菌培养的定量分析结果 ($\bar{x} \pm s, \times 10^{-3}$ CFU/ml)

组别	眼数	点眼后不同时间细菌菌落数		
		5 d	7 d	14 d
BSS 对照组	6	68.28 ± 2.02	16.83 ± 1.64 ^a	18.75 ± 4.00 ^a
加替沙星点眼组	10	17.58 ± 2.71 ^c	11.75 ± 2.25 ^{ac}	4.17 ± 1.27 ^{abc}
联合点眼组	10	18.92 ± 1.38 ^c	4.98 ± 1.31 ^{acd}	0.32 ± 0.15 ^{abcd}

注: $F_{\text{分组}} = 34.750, P = 0.002; F_{\text{时间}} = 51.790, P = 0.001$. 与各自组内 5 d 值比较, ^a $P < 0.01$; 与各自组内 7 d 值比较, ^b $P < 0.01$; 与各自时间点 BSS 对照组比较, ^c $P < 0.01$; 与各自时间点加替沙星点眼组比较, ^d $P < 0.01$ (两因素方差分析, post-HOC 检验) BSS: 平衡盐溶液; CFU: 菌落形成单位

2.3 各组兔眼角膜组织病理学检查表现

联合点眼组点眼后 5 d,光学显微镜下可见角膜浅基质层胶原纤维轻度肿胀,排列紊乱,周围可见大量炎症细胞浸润,以中性粒细胞为主,组织溶解坏死 (图 3A);点眼后 7 d,炎症细胞浸润明显减少,可见纤维组

织增生,角膜溶解现象消失 (图 3B);点眼后 14 d,炎症细胞以淋巴细胞为主,转为慢性炎症过程,角膜组织纤维重新排列,呈现修复、增生状态 (图 3C)。加替沙星点眼组点眼后 5 d 大量中心粒细胞浸润 (图 3D),点眼后 7 d 中性粒细胞浸润减少,纤维组织增生 (图 3E),点眼后 14 d 少许炎症细胞浸润,组织修复 (图 3F)。

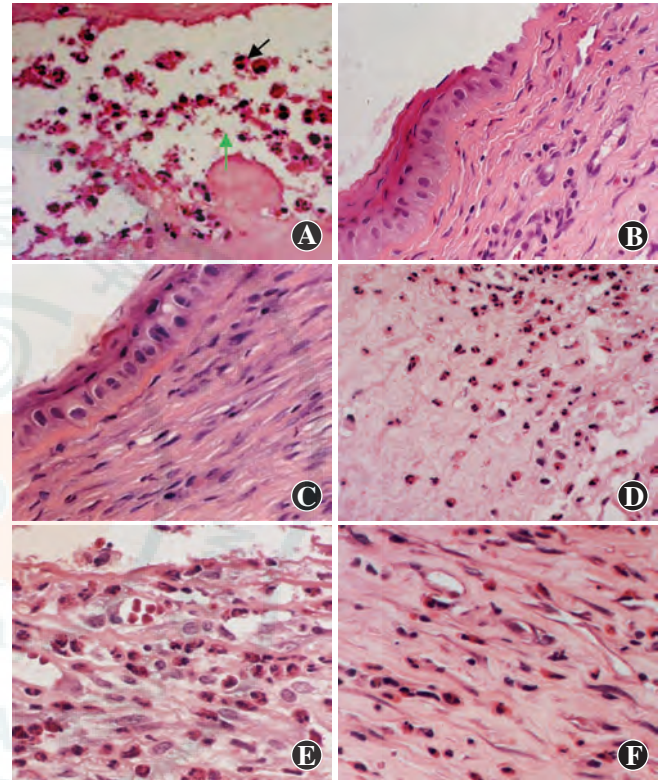


图 3 各组兔眼点眼后不同时间点角膜组织病理学表现 (HE × 200) A: 联合点眼组点眼后 5 d 可见角膜上皮及浅基质层大量炎症细胞浸润 (黑箭头),组织溶解坏死 (绿箭头) B: 联合点眼组点眼后 7 d,角膜组织中炎症细胞明显减少,基质纤维开始修复 C: 联合点眼组点眼后 14 d,角膜组织中炎症细胞以淋巴细胞为主,可见纤维增生 D: 加替沙星点眼组点眼后 5 d,角膜组织溶解坏死,大量中性粒细胞浸润 E: 加替沙星点眼组点眼后 7 d,中性粒细胞浸润减少,可见纤维组织增生 F: 加替沙星点眼组点眼后 14 d,可见少许炎症细胞浸润,组织修复

2.4 各组角膜中 MMP-2 及 MMP-9 的表达

联合点眼组点眼后 5 d,光学显微镜下可见兔角膜上皮层、水肿的胶原纤维间以及基质层坏死灶内 MMP-2 及 MMP-9 呈阳性表达 (图 4A, D);点眼后 7 d,兔角膜基质胶原纤维间以及中基质层坏死灶内 MMP-2 及 MMP-9 表达阳性,但较点眼后 5 d 表达强度减弱 (图 4B, E);点眼后 14 d,兔角膜组织中 MMP-2 及 MMP-9 表达程度明显减弱 (图 4C, F)。加替沙星点眼组点眼后 5 d 角膜上皮、基质层可见大量 MMP-2 及 MMP-9 表达区域,点眼 7 d 后仍呈较强表达,点眼后 14 d 表达减弱。各组兔眼点眼后随着用药时间的延长,

角膜组织中 MMP-2 与 MMP-9 的表达强度(A 值)逐渐减弱,3 个组间 A 值的总体比较差异均有统计学意义(MMP-2: $F_{\text{时间}} = 23.640, P = 0.022$; MMP-9: $F_{\text{时间}} = 12.390, P = 0.032$),其中各组内点眼后 7 d 和 14 d MMP-2 与 MMP-9 表达量均明显低于点眼后 5 d,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。BSS 对照组、加替沙星点眼组和联合点眼组间角膜组织中 MMP-2 与 MMP-9 表达量明显不同,总体比较差异均有统计学意义(MMP-2: $F_{\text{分组}} = 18.020, P = 0.028$; MMP-9: $F_{\text{分组}} = 23.620, P = 0.022$),各时间点加替沙星点眼组和联合点眼组 MMP-2 与 MMP-9 表达量均明显低于 BSS 对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 3)。

表 3 各组兔眼点眼后不同时间点角膜中 MMP-2 及 MMP-9 的表达量比较($\bar{x} \pm s, A$)

组别	眼数	点眼后不同时间点 MMP-2 表达量			点眼后不同时间点 MMP-9 表达量		
		5 d	7 d	14 d	5 d	7 d	14 d
BSS 对照组	6	0.365±0.057	0.238±0.037 ^a	0.221±0.066 ^a	0.290±0.065	0.208±0.033 ^a	0.248±0.069 ^a
加替沙星点眼组	10	0.343±0.074 ^b	0.203±0.056 ^{ab}	0.149±0.052 ^{ab}	0.204±0.042	0.188±0.032 ^{ab}	0.078±0.021 ^{ab}
联合点眼组	10	0.298±0.067 ^b	0.142±0.032 ^{ab}	0.114±0.023 ^{ab}	0.199±0.023	0.142±0.013 ^{ab}	0.033±0.012 ^{ab}

注: MMP-2: $F_{\text{分组}} = 18.020, P = 0.028$; $F_{\text{时间}} = 23.640, P = 0.022$ 。MMP-9: $F_{\text{分组}} = 23.620, P = 0.022$; $F_{\text{时间}} = 12.390, P = 0.032$ 。与各自组内点眼前 5 d 值比较, ^a $P < 0.05$;与各自时间点 BSS 对照组比较, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, post-HOC 检验) BSS:平衡盐溶液;MMP:基质金属蛋白酶

表 4 各组兔眼点眼后不同时间点角膜中 TNF- α 及 IL-1 β 质量浓度比较($\bar{x} \pm s, \text{pg/ml}$)

组别	样本量	点眼后不同时间点 TNF- α 水平			点眼后不同时间点 IL-1 β 水平		
		5 d	7 d	14 d	5 d	7 d	14 d
BSS 对照组	6	25.48±3.96	22.35±3.38	20.72±8.20	26.12±3.53	19.57±5.40	17.47±3.46
加替沙星点眼组	10	22.41±2.34	21.41±4.52	14.58±3.64	24.09±4.21	21.35±4.32	14.78±3.27
联合点眼组	10	21.99±4.56	18.46±4.49	9.32±2.89 ^{ab}	22.39±4.20	14.41±2.77	8.10±7.24 ^{ab}

注: TNF- α : $F_{\text{分组}} = 35.280, P = 0.002$; $F_{\text{时间}} = 18.230, P = 0.025$ 。IL-1 β : $F_{\text{分组}} = 12.630, P = 0.031$; $F_{\text{时间}} = 50.690, P = 0.001$ 。与各自组内 5 d 值比较, ^a $P < 0.05$,与各自组内 7 d 值比较, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, post-HOC 检验) BSS:平衡盐溶液;TNF:肿瘤坏死因子;IL:白细胞介素

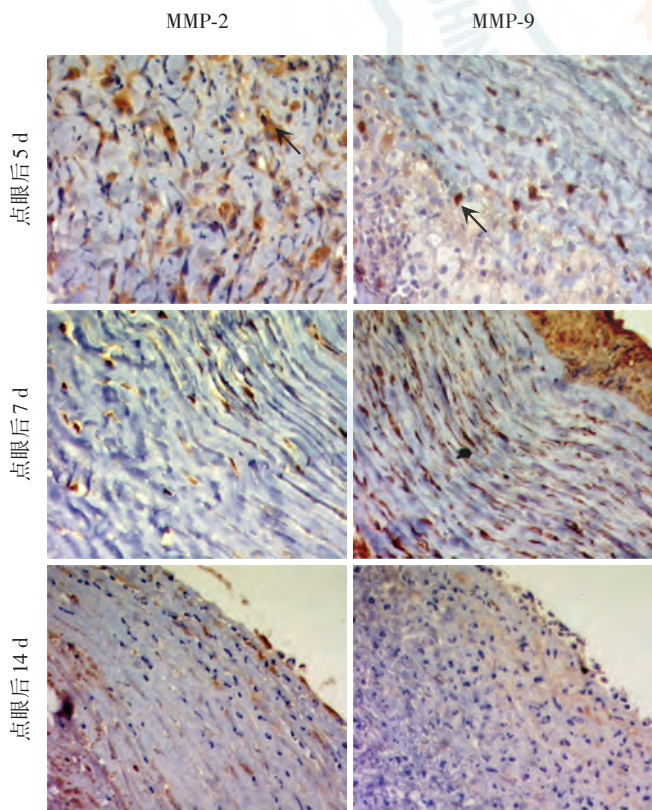


图 4 联合点眼组点眼后不同时间点兔角膜中 MMP-2 及 MMP-9 的表达变化(DAB $\times 400$) 点眼后 5 d,兔角膜上皮层、胶原纤维间以及基质层坏死灶内 MMP-2 及 MMP-9 表达呈强阳性(箭头)。点眼后 7 d,角膜基质胶原纤维间及中基质层坏死灶内 MMP-2 及 MMP-9 表达强度较点眼后 5 d 减弱。点眼后 14 d,兔角膜中 MMP-2 及 MMP-9 表达强度明显减弱

2.5 各组兔眼角膜组织中 TNF- α 、IL-1 β 质量浓度变化

TNF- α 及 IL-1 β 标准曲线方程相关系数分别为 0.997 1 及 0.992 2。点眼后 5 d,联合点眼组兔角膜组织中 TNF- α 及 IL-1 β 质量浓度均明显低于 BSS 对照组,差异均有统计学意义($P = 0.001, 0.030$);点眼后 7 d,联合点眼组 TNF- α 及 IL-1 β 质量浓度也低于 BSS 对照组,差异均有统计学意义($P = 0.003, 0.001$);点眼后 14 d,联合点眼组 TNF- α 及 IL-1 β 质量浓度明显低于 BSS 对照组,差异均有统计学意义($P = 0.001, 0.001$)。点眼后 14 d,联合点眼组 TNF- α 及 IL-1 β 质量浓度明显低于点眼后 5 d 和 7 d,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 4)。

3 讨论

感染性角膜炎是中国主要致盲眼病之一。临床实践中发现,感染性角膜炎患者尽管选用敏感的抗菌药物进行治疗,但部分患者角膜炎反应仍难以控制,其原因可能与微生物被药物杀灭后菌体崩解释放大量毒性分子导致的失控性炎症有关^[4]。失控性炎症反应为一种病理生理学的概念,是播撒性炎症细胞激活与炎症介质超常释放相互作用导致的免疫失衡现象^[9]。本研究拟围绕角膜感染后炎症失控这一科学问题的探讨建立动物模型,通过对感染角膜组织的病理学研究

及炎症因子的检测来阐明炎症失控的发病机制,并研究多西环素对角膜炎症失控反应的治疗作用。本研究中,我们在既往感染性角膜炎动物模型制作方法的基础上成功建立了符合公认的炎症失控反应标准的感染性角膜炎失控动物模型,为该研究领域的基础研究提供了方法学基础。

研究证实,与角膜感染相关的促炎细胞因子有 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、血小板活化因子(platelet-activating factor, PAF)、IFN-1, 抗炎细胞因子有 IL-4、IL-10、IL-13、IL-17 和 IL-1 α ^[10-12]。本研究通过 ELISA 检测发现炎症失控反应模型眼角膜中 TNF- α 和 IL-1 β 含量明显升高,免疫组织化学研究发现模型眼角膜组织中 MMPs 表达呈强阳性,从而使角膜基质胶原代谢发生异常,造成角膜溶解,炎性因子和 MMPs 的相互作用可导致角膜溃疡修复困难,产生炎症失控反应。

多西环素能显著抑制促炎细胞因子的释放,并可抵抗角膜基质胶原代谢作用,是良好的 MMPs 阻断剂^[13-15]。其作用机制包括:(1)通过与 MMPs 活性位点上的 Zn²⁺结合,抑制酶活化,从而直接抑制 MMPs 对胶原破坏;(2)通过抑制 MMPs 活性影响炎症细胞的游走移行;(3)通过抑制基质破坏抑制细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)的表达;(4)多西环素在纤溶酶原存在时以剂量依赖形式抑制胶原降解,其过程由 IL-1 α 介导,且抑制 MMP-1 前体转化为有活性的 MMP-1^[16-17]。既然多西环素具有抑制促炎细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)的表达,阻断 MMPs 对角膜组织的破坏作用,说明多西环素在角膜感染后炎症失控损伤过程中具有一定的抑制作用。孙旭光等^[18]报道了阿米巴角膜炎后期的炎症失控效应,并认为机体自身免疫反应在失控效应中起重要作用。目前关于感染性眼病炎症失控的研究主要集中在机制方面,而在其预防和治疗方面的研究较少。本研究中发现,多西环素与加替沙星联合应用能显著抑制促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达,并阻断 MMP-2 和 MMP-9 的表达。本研究还发现, BSS 组、加替沙星点眼组和联合点眼组在治疗过程中细菌数量存在明显的差异,所以 3 个组的临床评分的区别与感染的控制与否有着密切的关系,说明多西环素既能有效控制炎症,又可发挥抗菌效果。

综上所述,兔铜绿假单胞菌性角膜感染后,部分角膜发生炎症失控反应并释放大促炎因子及 MMPs,加速角膜组织坏死及溶解。多西环素可能通过抑制促炎细胞因子的释放以及抑制 MMPs 的表达来抑制兔角膜的炎症失控损伤,同时在控制感染的过程中,多西环素也可能发挥了抗菌效果。

参考文献

- [1] Song X, Xie L, Tan X, et al. A multi-center, cross-sectional study on the burden of infectious keratitis in China [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(12): e113843 [2015-10-11]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0113843>. DOI:10.1371/journal.pone.0113843.
- [2] Ament JD, Todani A, Pineda R, et al. Global corneal blindness and the Boston keratoprosthesis type I [J]. Am J Ophthalmol, 2010, 149(4): 537-539. DOI:10.1016/j.ajo.2009.11.001.
- [3] Li Z, Cui H, Zhang L, et al. Prevalence of and associated factors for corneal blindness in a rural adult population (The Southern Harbin Eye Study) [J]. Curr Eye Res, 2009, 34(8): 646-651.
- [4] Xu F, Dai CL, Wu XM, et al. Overwhelming postsplenectomy infection due to Mycoplasma pneumoniae in an asplenic cirrhotic patient: case report [J]. BMC Infect Dis, 2011, 11: 162 [2015-10-25]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3118146>. DOI: 10.1186/1471-2334-11-162.
- [5] Hobden JA, Engel LS, Callegan MC, et al. Pseudomonas aeruginosa keratitis in leukopenic rabbits [J]. Curr Eye Res, 1993, 12(5): 461-467.
- [6] Balzli CL, McCormick CC, Caballero AR, et al. The effectiveness of an improved combination therapy for experimental Staphylococcus aureus keratitis [J]. Adv Ther, 2010, 27(12): 933-940. DOI: 10.1007/s12325-010-0082-x.
- [7] Aldehbi YH, Mohamed HA, Aly SM. Histopathological studies on rabbits infected by bacteria causing infectious keratitis in human through eye inoculation [J]. Int J Health Sci (Qassim), 2014, 8(3): 257-267.
- [8] Shan Q, Dwyer M, Rahman S, et al. Distinct susceptibilities of corneal Pseudomonas aeruginosa clinical isolates to neutrophil extracellular trap-mediated immunity [J]. Infect Immun, 2014, 82(10): 4135-4143. DOI: 10.1128/IAI.02169-14.
- [9] Morgan TL, Tomich EB. Overwhelming post-splenectomy infection (OPSI): a case report and review of the literature [J]. J Emerg Med, 2012, 43(4): 758-763. DOI:10.1016/j.jemermed.2011.10.029.
- [10] Yamaguchi T, Calvacanti BM, Cruzat A, et al. Correlation between human tear cytokine levels and cellular corneal changes in patients with bacterial keratitis by in vivo confocal microscopy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(11): 7457-7466. DOI:10.1167/iovs.14-15411.
- [11] Fukuda K, Ishida W, Tanaka H, et al. Inhibition by rebamipide of cytokine-induced or lipopolysaccharide-induced chemokine synthesis in human corneal fibroblasts [J]. Br J Ophthalmol, 2014, 98(12): 1751-1755. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2014-305425.
- [12] Tam C, Mun JJ, Evans DJ, et al. Cytokeratins mediate epithelial innate defense through their antimicrobial properties [J]. J Clin Invest, 2012, 122(10): 3665-3677. DOI:10.1172/JCI64416.
- [13] Malamos P, Georgalas I, Rallis K, et al. Evaluation of single-dose azithromycin versus standard azithromycin/doxycycline treatment and clinical assessment of regression course in patients with adult inclusion conjunctivitis [J]. Curr Eye Res, 2013, 38(12): 1198-1206. DOI:10.3109/02713683.2013.822893.
- [14] Li H, Ezra DG, Burton MJ, et al. Doxycycline prevents matrix remodeling and contraction by trichiasis-derived conjunctival fibroblasts [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(7): 4675-4682. DOI: 10.1167/iovs.13-11787.
- [15] Guzman DS, Diaz-Figueroa O, Tully T Jr, et al. Evaluating 21-day doxycycline and azithromycin treatments for experimental Chlamydia psittaci infection in cockatiels (Nymphicus hollandicus) [J]. J Avian Med Surg, 2010, 24(1): 35-45. DOI: <http://dx.doi.org/10.1647/2009-009R.1>.
- [16] Lekhanont K, Park CY, Smith JA, et al. Effects of topical anti-inflammatory agents in a botulinum toxin B-induced mouse model of keratoconjunctivitis sicca [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2007, 23(1): 27-34. DOI:10.1089/jop.2006.0071.
- [17] Masud H, Qureshi TQ, Dukley M, et al. Effects of Ivermectin with and without doxycycline on clinical symptoms of onchocerciasis [J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2009, 19(1): 34-38. DOI:10.2009/JCPS.3438.
- [18] 陈威, 孙旭光, 梁庆丰, 等. 兔铜绿假单胞菌性角膜炎的组织病理学研究 [J]. 眼科研究, 2009, 27(1): 27-31. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2009.01.007.
Chen W, Sun XG, Liang QF, et al. The clinical and histopathologic changes of experimental Acanthamoeba keratitis in rabbit [J]. Chin Ophthalmol Res, 2009, 27(1): 27-31.

(收稿日期:2015-11-13)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)