

· 实验研究 ·

改性壳聚糖滴眼液对兔白念珠菌性角膜炎的治疗作用及安全性评价

杨瑞波¹ 高奕晨¹ 朱萌² 牛忠伟² 张琛¹ 刘慧¹ 黄悦¹ 高云华² 赵少贞¹

¹天津医科大学眼科医院 眼视光学院 眼科研究所 天津市视网膜功能与疾病重点实验室 300384; ²中国科学院理化技术研究所, 北京 100190

通信作者: 赵少贞, Email: zhaosz1997@sina.com

【摘要】 目的 评价改性壳聚糖滴眼液在白念珠菌性角膜炎动物模型中的治疗作用及安全性。方法 选取 10 只健康成年雌性新西兰白兔, 以右眼为实验眼, 采用角膜接触镜法建立浅层白念珠菌性角膜炎模型。经裂隙灯显微镜及角膜刮片显微镜检查结果初步判定造模成功的新西兰白兔, 采用随机数字表法分为模型组和改性壳聚糖点眼组, 根据真菌培养结果最终判定造模成功的模型兔, 另选 5 只兔为正常对照组, 不做处理。正常对照组和改性壳聚糖点眼组局部给予改性壳聚糖滴眼液点眼, 每日 6 次, 1 周后改为每日 4 次, 继续用药 1 周后停药; 模型组不给予治疗。用药期间每天裂隙灯显微镜下观察各组角膜病灶及眼表变化, 于造模后第 1、7、14、21、28 天行裂隙灯显微镜照相并进行眼部症状评分, 并记录角膜愈合时间。停药后继续观察各组实验眼角膜情况 2 周。结果 8 只模型兔实验眼角膜刮片显微镜检查结果为真菌菌丝和孢子阳性, 培养分离的菌株与接种菌株一致, 造模成功率为 80% (8/10)。造模后第 7、14、21 天, 模型组感染程度评分分别为 (14.50±0.58)、(6.25±0.50) 和 (2.50±0.58) 分, 明显高于相应时间点改性壳聚糖点眼组的 (7.25±1.26)、(2.75±0.50) 和 (1.25±0.50) 分, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。模型组于造模后 7 d 内, 角膜水肿明显加重, 中央白色溃疡范围增大, 造模后 7~28 d 角膜溃疡逐渐愈合, 平均愈合时间为 (24.5±2.6) d, 最终遗留角膜瘢痕及新生血管。改性壳聚糖点眼组造模后 7 d 内角膜浸润明显减轻, 造模后 14 d 角膜刮片镜检及真菌培养结果均为阴性, 平均愈合时间为 (13.5±1.3) d, 明显短于模型组, 差异有统计学意义 ($t = 7.47, P < 0.01$)。造模后 28 d 改性壳聚糖点眼组实验眼未见角膜炎复发, 治愈率为 100%。正常对照组局部用药期间未见眼睑结膜充血水肿及角膜损伤表现。结论 改性壳聚糖滴眼液治疗兔眼浅层白念珠菌性角膜炎模型安全、有效, 眼表刺激性小。

【关键词】 角膜炎; 白念珠菌; 改性壳聚糖; 治疗作用

基金项目: 天津市自然科学基金项目 (19JCYBJC25700)

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-0160.2020.03.003

Efficacy and safety of modified chitosan eye drops in the treatment of *Candida albicans* keratitis in rabbits

Yang Ruibo¹, Gao Yichen¹, Zhu Meng¹, Niu Zhongwei¹, Zhang Chen¹, Liu Hui¹, Huang Yue¹, Gao Yunhua², Zhao Shaozhen¹

¹Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases, Eye Institute, School of Optometry, Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China; ²Technical Institute of Physics and Chemistry Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Corresponding author: Zhao Shaozhen, Email: zhaosz1997@sina.com

[Abstract] **Objective** To evaluate the clinical efficacy and safety of modified chitosan eye drops on rabbit *Candida albicans* keratitis model. **Methods** Ten healthy female New Zealand rabbits were used to establish the superficial *Candida albicans* keratitis model by the corneal surface lens method in the right eye. Slit lamp microscopy and corneal scraping and microscopic examination were performed to preliminarily determine whether the keratitis model has been successfully established, the rabbits were then randomly divided into a model group and a modified chitosan group by the random number table method. The successfully established rabbit models which were determined by fungal culture results were retained. Five normal rabbits receiving no intervention served as a normal control group. The experimental eyes in the normal control and modified chitosan groups were treated with modified chitosan eye drops, Six times a day for one week, and subsequently four times a day for one week. No treatment was administered to the model group. The changes of corneal lesions and ocular surfaces were examined by slit lamp microscopy every day.

At 1, 7, 14, 21 and 28 days after modeling, the eye condition and corneal clinical scores was assessed by slit lamp microscopy. The corneal conditions in each group was observed for two weeks after drug withdrawal. **Results** The corneal scraping and microscopic examination results of eight rabbits models showed that the fungal hyphae and spores were positive. The fungal culture results showed that the separated pathogen was *Candida albicans*. The success rate of modeling was 80% (8/10). The clinical scores in the model group at 7, 14 and 21 days after modeling were 14.50 ± 0.58 , 6.25 ± 0.50 and 2.50 ± 0.58 , respectively, and were significantly higher than 7.25 ± 1.26 , 2.75 ± 0.50 and 1.25 ± 0.50 in the modified chitosan group (all at $P < 0.05$). In the model group, corneal edema was significantly aggravated, and the central white ulcer area was enlarged within seven days after modeling. Between 7 and 28 days after modeling, the corneal ulcer was gradually healed, while the central corneal scar and neovascularization were remained. The average healing time was (24.5 ± 2.6) days. In the modified chitosan group, the corneal infiltration was significantly alleviated within seven days after modeling, and the fungal hyphae and spores of corneal scraping were negative on the 14th day after modeling. The average healing time in the modified chitosan group was (13.5 ± 1.3) days, which was significantly shorter than that in the the model group ($P < 0.01$). No recurrence of keratitis was observed in the modified chitosan group after two weeks of drug withdrawal. The cure rate was 100%. In the normal control group, the conjunctival hyperemia, corneal edema, and lesions were not observed during topical administration.

Conclusion The treatment with modified chitosan eye drop is effective in a rabbit superficial *Candida albicans* keratitis model, and have no obvious toxic effects on ocular tissues.

[Key words] Keratitis; *Candida albicans*; Modified chitosan; Therapeutic effect

Fund program: National Natural Science Foundation of Tianjin (19JCYBJC25700)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.03.003

真菌性角膜炎 (fungal keratitis, FK) 是发病率和致盲率均较高的感染性角膜炎, 并已成为中国部分地区主要致盲角膜疾病^[1]。由于临床抗真菌药物存在种类有限, 对眼表刺激性大, 角膜穿透性差, 全身应用毒性和不良反应显著等问题^[2-3], FK 的临床药物治疗较细菌性角膜炎更加棘手。FK 的手术治疗近年来虽取得一定成效, 但仍面临供体角膜材料缺乏、手术费用较高及 FK 复发等问题^[4-5], 限制其临床广泛开展。因此, 眼表刺激性小、组织穿透性好、高效低毒的新型抗真菌药物亟需开发与应用。壳聚糖抗菌活性强, 可有效抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白念珠菌, 且具有细胞毒性低、生物相容性良好等优点^[6-7]。然而, 由于壳聚糖难溶于水 and 有机溶剂, 使其生物应用受到限制。本课题组通过调控正电荷与亲疏水性平衡制备了具有良好水溶性的改性壳聚糖。前期实验证实改性后的壳聚糖具有良好的生物安全性, 对皮肤、眼及阴道黏膜均无刺激性、无致敏性、无细胞毒性及生殖毒性且具有控制细菌感染与促进感染创面愈合作用^[8]。然而改性壳聚糖的抗真菌作用仍需进一步体内实验验证。本研究首次将改性壳聚糖滴眼液应用于兔白念珠菌性角膜炎模型眼中, 评价改性壳聚糖滴眼液的治疗作用及安全性, 以期临床治疗 FK 提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及菌株 健康成年雌性新西兰大白

兔 15 只 (北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司), 体质量 2.0~2.5 kg, 裂隙灯显微镜检查角膜透明, 无眼部病变。实验动物均饲养于天津医科大学眼科研究所, 自由饮水与进食, 饲养环境符合医学实验动物环境的要求。白念珠菌标准菌株由南开大学生命科学院微生物学系惠赠。

1.1.2 主要试剂及仪器 质量分数 0.5% 左氧氟沙星滴眼液 (日本参天制药株式会社); 3.5 mg/ml 改性壳聚糖水溶液 (中国科学院理化技术研究所); 沙氏琼脂培养基 (Sabouraud dextrose agar, SDA) (北京索莱宝科技有限公司); 软性角膜接触镜 (美国博士伦公司); 裂隙灯显微镜 (日本 Topcon 公司)。

1.2 方法

1.2.1 白念珠菌悬浊液的配制 白念珠菌培养于 SDA 培养基中, 37 °C 下培养 72 h。接种环刮取培养基中的白色菌落, 悬浮于无菌生理盐水中, 红细胞计数板计数并调整悬浊液浓度为 1×10^{10} CFU/ml。白念珠菌悬浊液现配现用。

1.2.2 浅层白念珠菌性角膜炎动物模型的制作 取 10 只新西兰大白兔, 采用盐酸氯胺酮 25 mg/kg、盐酸氯丙嗪 10 mg/kg 混合液肌肉注射麻醉。以右眼为实验眼, 采用角膜接触镜法建立兔浅层白念珠菌性角膜炎模型^[9]: 无菌条件下, 聚维酮碘消毒眼周, 开睑器开睑, 直径为 7 mm 的角膜环钻置于实验眼角膜中央做印迹, 角膜刮匙完整刮除印迹范围内角膜上皮, 覆盖软性角膜接触镜, 挤出接触镜与角膜间气泡后注入

0.1 ml 新鲜配制的白念珠菌悬浊液,行暂时性睑裂缝合术;缝合后 48 h 拆除眼裂缝合线并取出角膜接触镜。动物模型制作均由同一名经验丰富的医生完成。裂隙灯显微镜下观察角膜情况后,于手术显微镜下以无菌刮匙刮取兔眼病变区角膜组织,均匀涂于无菌载玻片上,行革兰染色,覆以盖玻片,光学显微镜下观察;同时,角膜病灶拭子标本送真菌培养 3~5 d,进行菌株鉴定。根据角膜溃疡及浸润情况,结合当日角膜刮片显微镜检查发现真菌菌丝和/或孢子,初步判定造模成功;同时角膜病灶拭子真菌培养菌株鉴定证实与接种菌株一致后,最终确定造模成功。

1.2.3 实验分组及处理 取初步判定造模成功的模型兔采用随机数字表法随机分为模型组和改性壳聚糖点眼组,每组 5 只。另选取 5 只正常新西兰大白兔作为正常对照组。术前 3 d,各组白兔双眼预防性 0.5%

左氧氟沙星滴眼液点眼,每日 4 次。分组后模型组不给予处理,其余 2 个组实验眼均给予改性壳聚糖滴眼液点眼,每日 6 次,1 周后改为每日 4 次,继续用药 1 周后停药;期间根据菌株鉴定结果,剔除与接种菌株不一致的白兔。停药后,继续观察各组实验眼角膜情况 2 周。模型治愈判定:裂隙灯显微镜下观察角膜溃疡完全愈合,结膜充血完全消退,实验室刮片培养阴性,停药后 2 周内角膜炎症无复发。

1.2.4 角膜情况观察 造模后由同一观察者每日裂隙灯显微镜下观察各组实验眼角膜感染情况、角膜病灶及眼表变化。于造模后第 1、7、14、21、28 天行裂隙灯显微镜照相并根据角膜溃疡面积(0~4 分)、混浊程度(0~4 分)、前房反应(0~4 分)及结膜充血(0~3 分)情况对实验眼感染程度进行评分(表 1),并记录角膜愈合时间。

表 1 兔眼感染程度评分标准^[10-11]
Table 1 Scoring standard for the infection degree of the rabbit eyes^[10-11]

溃疡面积评分	混浊程度评分	前房反应评分	结膜充血评分
0 分:角膜透明,无浸润及溃疡	0 分:角膜透明,虹膜纹理清晰	0 分:前房水清,房水闪辉、细胞阴性	0 分:无充血
1 分:病灶累及中央 7 mm 区域的 1%~25%	1 分:角膜轻度雾状或毛玻璃样混浊,虹膜纹理可辨	1 分:前房可见细胞、房水闪辉或纤维素性渗出	1 分:角膜缘血管环轻度充血
2 分:病灶累及中央 7 mm 区域的 26%~50%	2 分:角膜灰白色混浊,累及浅层基质,透过病灶模糊可见虹膜纹理	2 分:前房可见线状或片状灰白色脓性渗出,未形成液平面	2 分:角膜缘血管环中度充血
3 分:病灶累及中央 7 mm 区域的 51%~75%	3 分:角膜灰白色混浊,累及深层基质,透过病灶仅见前房,虹膜纹理不清	3 分:前房积脓形成液平面,但不与角膜病灶相连	3 分:角膜缘血管环重度充血,血管怒张
4 分:病灶累及全角膜	4 分:角膜灰白色致密混浊,视不清前房	4 分:前房多量积脓,与角膜病灶相连	

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析。模型组和改性壳聚糖点眼组感染程度评分及角膜愈合时间数据经 W 检验均符合正态分布,以 mean±SD 表示。模型组和改性壳聚糖点眼组不同时间点感染程度评分比较采用重复测量两因素方差分析,组间多重比较采用 Tukey 检验。2 个组角膜愈合时间比较采用独立样本 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白念珠菌性角膜炎动物模型制作情况

本次实验共造模 10 眼,8 眼角膜刮片显微镜检查可见大量真菌菌丝(图 1A),初步判定造模成功;这 8 眼菌株鉴定结果均显示与接种菌株一致(图 1B),未合并其他真菌或细菌感染,最终确定造模成功,成功率为 80%。

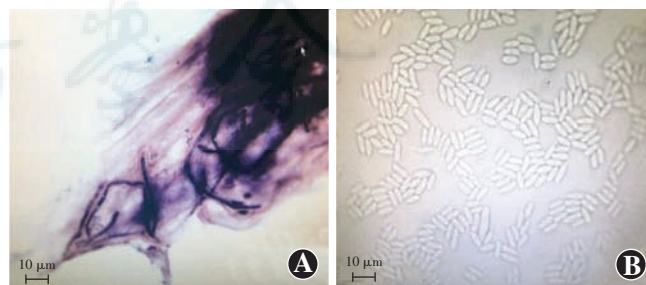


图 1 白念珠菌性角膜炎动物模型兔眼角膜刮片显微镜检查及真菌培养结果 A:角膜刮片显微镜检查结果(×1 000,标尺=10 μm,革兰染色)可见大量真菌菌丝 B:真菌菌株培养鉴定结果(×1 000,标尺=10 μm)可见白念珠菌生长,与接种菌株一致

Figure 1 The results of corneal scraping microscopic examination and fungal culture of the rabbit *Candida albicans* keratitis model

A: The corneal scraping microscopic examination result of model eyes (×1 000, bar = 10 μm, Gram stain) fungal hyphae was observed B: The fungal culture result of model eyes (×1 000, bar = 10 μm) the separated pathogen was *Candida albicans*.

2.2 各组眼部表现

造模后第 1 天,模型组、改性壳聚糖点眼组均可见结膜中度充血,角膜全层水肿,角膜中央浅层溃疡形成,浸润范围约 2/3 角膜面积,前房结构窥不清。造模后第 7 天,模型组结膜重度充血,角膜水肿加重,角膜中央溃疡浸润加深,全周角膜新生血管长入;改性壳聚糖点眼组结膜轻度充血,角膜水肿减轻,角膜浸润范围缩小至约 1/5 角膜面积,可透见虹膜纹理。造模后第 14 天,模型组结膜轻度充血,角膜水肿减轻,浸润范围

持续缩小,角膜新生血管长至角膜中央;改性壳聚糖点眼组结膜充血消退,角膜浸润消退,溃疡瘢痕愈合。造模后第 21 天,模型组角膜浸润范围缩小至约 1/10 角膜面积,结膜充血进一步减轻,角膜新生血管变细缩短。造模后第 28 天,模型组结膜充血消退,遗留中央区角膜瘢痕。改性壳聚糖点眼组造模后 14~28 d,角膜瘢痕持续缩小,未见角膜炎复发(图 2)。正常对照组用药前与用药 2 周时均未见兔眼畏光、流泪、闭眼等眼表刺激症状,未见眼睑结膜充血水肿及角膜损伤表现(图 3)。

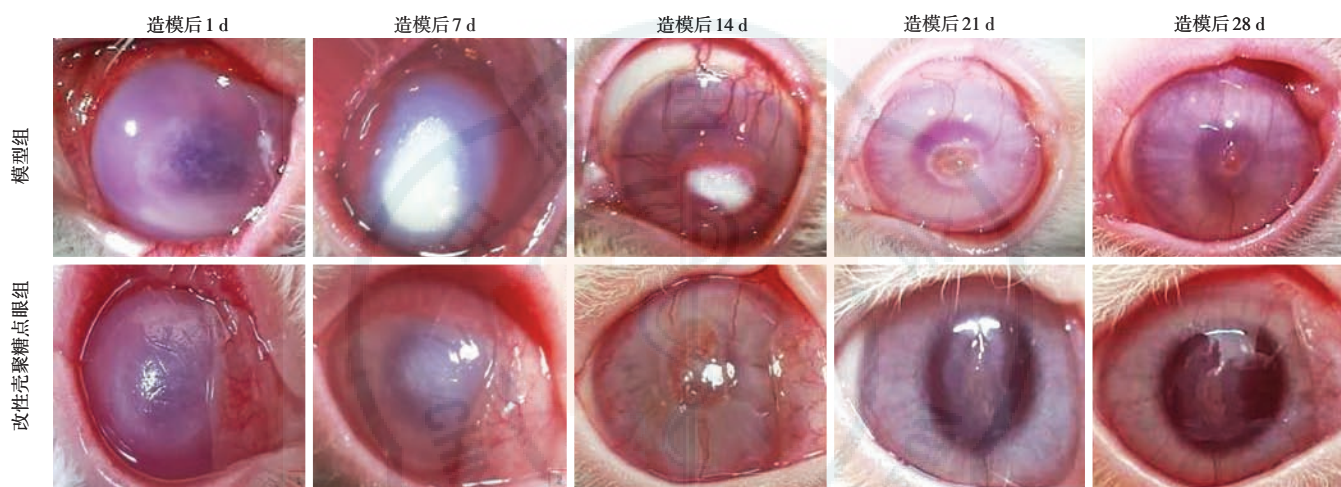


图 2 模型组、改性壳聚糖点眼组造模后不同时间点角膜及眼表情况变化 造模后第 1 天,2 个组角膜均呈灰白色浅层溃疡,溃疡约占 2/3 角膜面积,角膜全层水肿;造模后第 7 天,模型组角膜中央溃疡浸润加深扩大,角膜水肿加重,全周新生血管长入角膜,改性壳聚糖点眼组角膜水肿减轻,浸润范围缩小至约 1/5 角膜面积;造模后第 14 天,模型组结膜充血减轻,中央溃疡及浸润范围缩小至约 1/6 角膜面积,新生血管长至角膜中央,改性壳聚糖点眼组角膜浸润消退,溃疡瘢痕愈合;造模后第 21 天,模型组结膜充血进一步减轻,角膜中央区溃疡及浸润范围缩小至约 1/10 角膜面积,改性壳聚糖点眼组角膜中央瘢痕缩小;造模后第 28 天,模型组遗留中央区角膜瘢痕,改性壳聚糖点眼组角膜中央瘢痕缩小,未见角膜炎复发

Figure 2 The changes of corneal lesions and ocular surface status at different times after modeling in the model group and modified chitosan group On the 1st day after modeling, corneal edema, pale white superficial ulcer was observed in the two groups, which accounted for about 2/3 of the corneal area. On the 7th day after modeling, the central infiltration range was increased, the corneal edema was severe and peripheral corneal neovascularization invaded cornea in the model group; the corneal edema was alleviated and the infiltration area was reduced to about 1/5 of the corneal area in the modified chitosan group. On the 14th day after modeling, conjunctiva hyperemia was reduced, central infiltration area was reduced to about 1/5 of the corneal area, and neovascularization grew to the central cornea in the model group; the corneal infiltration subsided and the corneal ulcer was healed in the modified chitosan group. On the 21th day after modeling, conjunctival hyperemia was further alleviated, and the central infiltration area was reduced to about 1/10 of the corneal area in the model group; the central corneal scar was reduced in the modified chitosan group. On the 28th day after modeling, the central corneal scar was formed in the model group and the central corneal scar was reduced without the recurrence of keratitis in the modified chitosan group

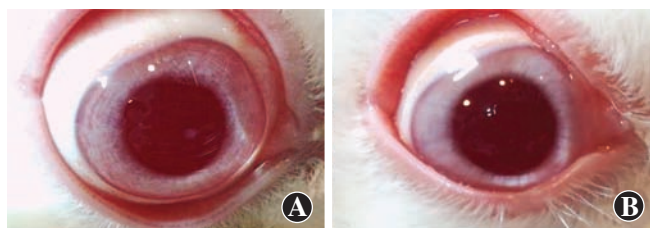


图 3 正常对照组用药前后眼表表现 用药前和用药 2 周后均未见眼睑结膜充血水肿及角膜损伤表现 A: 改性壳聚糖点眼前 B: 改性壳聚糖点眼后 2 周

Figure 3 The changes of eye surface before and after administration in the normal control group The conjunctiva hyperemia, edema and corneal lesions were not observed during the 2 weeks of topical administration in the normal control group A: Before modified chitosan treatment B: Two weeks after modified chitosan treatment

各时间点模型组和改性壳聚糖点眼组实验眼角膜临床评分总体比较,差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 136.9, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 337.5, P < 0.01$)。造模后第 7、14 和 21 天,模型组角膜感染程度评分明显高于相应时间点改性壳聚糖点眼组,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$),其他时间点两组比较,差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 2)。

2.3 2 个组角膜愈合时间比较

裂隙灯显微镜观察可见,造模后 7 d 内为角膜病变反应加重期,造模后 7~28 d 随新生血管侵入角膜中央,角膜溃疡逐渐愈合。模型组和改性壳聚糖点眼组

角膜愈合时间分别为(24.5±2.6)和(13.5±1.3)d,改性壳聚糖点眼组愈合时间明显短于模型组,差异有统计学意义($t=7.47, P<0.01$)。

表 2 各组兔造模后不同时间点角膜感染程度评分比较(mean±SD,分)
Table 2 Comparison of corneal scores at different time points after modeling (mean±SD)

组别	眼数	造模后不同时间点角膜感染程度评分				
		1 d	7 d	14 d	21 d	28 d
模型组	4	9.75±0.96	14.50±0.58	6.25±0.50	2.50±0.58	1.50±0.58
改性壳聚糖点眼组	4	9.75±0.50	7.25±1.26 ^a	2.75±0.50 ^a	1.25±0.50 ^a	0.75±0.50

注: $F_{\text{分组}} = 136.9, P<0.01$; $F_{\text{时间}} = 337.5, P<0.01$; $F_{\text{交互作用}} = 36.2, P<0.01$ 。与各自时间点模型组比较, $^a P<0.05$ (重复测量两因素方差分析, Tukey 检验)
Note: $F_{\text{分组}} = 136.9, P<0.01$; $F_{\text{时间}} = 337.5, P<0.01$; $F_{\text{交互作用}} = 36.2, P<0.01$ 。Compared with the model group at corresponding time, $^a P<0.05$ (repeated measurement two-way ANOVA, Tukey test)

3 讨论

FK 是一种由致病真菌引起的致盲率极高的感染性角膜炎^[12]。由于植物性外伤增多、角膜接触镜的普及、糖皮质激素或抗生素滥用、角膜移植或眼部免疫力下降等因素, FK 的发病率呈逐年上升趋势^[2,13]。该病起病相对隐匿,病程长、易复发,危害性极大,若诊断和治疗不及时,将进一步导致角膜溃疡,甚至穿孔,并可能进展为眼内炎,使视力严重受损,严重者可致盲或摘除眼球^[14]。因此, FK 的诊治长期以来都受到国内外研究者的广泛关注。

目前, FK 的首选治疗方法为药物治疗,包括局部应用抗真菌滴眼液及全身应用抗真菌药^[14]。然而,局部点眼抗真菌药物的角膜组织穿透力差,眼表毒性及刺激性大,对于角膜中深部真菌病灶难以发挥有效治疗作用,且目前商品化局部抗真菌药物奇缺;全身应用抗真菌药物引起的肝脏、肾脏及胃肠等不良反应显著,限制其临床广泛应用;真菌致病菌种多样,耐药率高。中华医学会提出 FK 的治疗可依据药物敏感性试验结果,选择 2 种或 2 种以上抗真菌药物联合应用以加强局部抗真菌作用^[15],但联合应用抗真菌药物将加大药物的眼表毒性及刺激性。

目前对于药物控制不佳的 FK,积极的手术治疗也已取得较好疗效^[14-15]。但由于面临手术难度大、供体角膜材料缺乏、手术费用较高、术后可能存在角膜炎复发等问题^[4-5,16],限制了其在临床各级医疗机构广泛

开展。此外,无论选择何种术式,手术前后依然需要应用抗真菌药物,防止病情进展,控制真菌复发,巩固手术疗效^[17]。因此,目前临床上亟需新型眼表刺激性小、组织穿透性好、高效低毒的抗真菌药物。

鉴于念珠菌为 FK 的常见病原菌^[2,15,18],本研究中应用角膜接触镜法制备兔浅层白念珠菌性角膜炎模型,结果显示模型组造模后 1~7 d,角膜溃疡呈逐渐扩大趋势,充血加重,伴随新生血管增多,随后角膜溃疡病灶逐渐缩小,但伴随大量新生血管长入,造模后 14~21 d 角膜中央溃疡仍存在,至造模后 28 d 角膜中央完成瘢痕化,与 Gyanfosu 等^[10]观察的兔白念珠菌性角膜炎发展趋势一致,感染后角膜新生血管生长情况与 Pork 等^[19]研究结果相符。

壳聚糖是一种主要来源于甲壳动物表皮、昆虫和一些细菌及真菌细胞壁的天然高分子物质,具有良好的生物相容性、无毒、抑菌、抗肿瘤等特性,已在农业、医药、食品及环境保护等领域广泛应用^[7,20]。在医疗领域,壳聚糖及其衍生物已应用于药物载体、创伤修复、神经修复等方面^[21-23]。然而,壳聚糖在水和有机溶剂中溶解度较低,极大限制了其高效利用。壳聚糖可塑性极强,其分子结构、物理性状等方面均可依据实际需求进行改进。为此,近年来研究者通过物理或化学等方法,对壳聚糖进行结构改造,研制出具有更高抗菌活性、水溶性强的壳聚糖衍生物,使其应用领域进一步拓展^[20,24-26]。本研究组根据壳聚糖结构特性,利用改性壳聚糖分子结构中的正电荷与亲疏水性平衡,使其通过干扰细胞膜、破坏真菌细胞壁的作用,达到杀菌效果^[27]。前期体外实验证实改性后的壳聚糖对白念珠菌、大肠杆菌及金黄色葡萄球菌的杀菌率达到 99%;对皮肤、眼和阴道黏膜均无刺激性,无致敏性;急性毒性测试结果显示无细胞毒性及生殖毒性。

目前尚缺乏将改性壳聚糖应用于兔眼角膜真菌感染模型相关研究报道。本研究观察发现,改性壳聚糖点眼组局部用药后 3 d 即可见角膜角膜基质浸润减轻,用药后 7 d 浸润缩小至 1/5 角膜面积,造模后 7~14 d,角膜病灶即逐渐愈合,角膜中央瘢痕化,停药后 2 周,未见角膜炎复发,治愈率达 100%。造模后第 7、14、21 天,改性壳聚糖点眼组感染程度评分均明显低于相应时间点模型组;改性壳聚糖点眼组角膜溃疡愈合时间约为模型组的一半。

综上所述,改性壳聚糖滴眼液对浅层白念珠菌性角膜炎模型的炎症控制及缩短病程方面起到积极作用。正常对照眼局部用药期间未出现眼表刺激症状及眼睑结膜充血水肿表现,说明改性壳聚糖滴眼液具备

眼表刺激性小、眼表生物相容性及安全性高等优点,为今后进一步临床应用提供了实验基础。基于角膜组织特性、真菌致病特点及壳聚糖的强可塑性等特点,今后我们将通过开发壳聚糖新型制剂,如设计改性壳聚糖微针植入角膜基质,或进一步改良其分子结构设计提高其角膜穿透性等,观察其对角膜中深部真菌感染模型的治疗作用及生物安全性,并与其他商品化抗真菌药物进行对比,为改性壳聚糖治疗中深部真菌性角膜炎及其他种属真菌性角膜炎提供更多参考依据。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 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.
- [2] He D, Hao J, Gao S, et al. Etiological analysis of fungal keratitis and rapid identification of predominant fungal pathogens[J]. Mycopathologia, 2016, 181(1-2): 75-82. DOI: 10.1007/s11046-015-9950-x.
- [3] Chang HY, Chodosh J. Diagnostic and therapeutic considerations in fungal keratitis[J]. Int Ophthalmol Clin, 2011, 51(4): 33-42. DOI: 10.1097/IIO.0b013e31822d64dc.
- [4] 姜亚萍, 陈轶卉. 真菌性角膜炎的治疗进展[J]. 国际眼科杂志, 2015, (9): 1542-1545. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.9.13. Jiang YP, Chen YH. Advances of the treatment for fungal keratitis[J]. Intern J Ophthalmol, 2015, (9): 1542-1545. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.9.13.
- [5] Ong HS, Corbett MC. Corneal infections in the 21st century [J]. Postgrad Med J, 2015, 91(1080): 565-571. DOI: 10.1136/postgradmedj-2015-133323.
- [6] Cheung RC, Ng TB, Wong JH, et al. Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications [J]. Mar Drugs, 2015, 13(8): 5156-5186. DOI: 10.3390/md13085156.
- [7] Yong SK, Shrivastava M, Srivastava P, et al. Environmental applications of chitosan and its derivatives[J]. Rev Environ Contam Toxicol, 2015, 233: 1-43. DOI: 10.1007/978-3-319-10479-9_1.
- [8] Zhu M, Liu P, Shi H, et al. Balancing antimicrobial activity with biological safety: Bifunctional chitosan derivative for the repair of wounds with gram-positive bacterial infections [J]. Mate Chem B, 2018, 6(23): 3884-3893. DOI: 10.1039/c8tb00620b.
- [9] 刘廷, 徐园园, 陈豪, 等. 改良角膜表面镜片术法建立兔曲霉菌性角膜炎动物模型[J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(2): 101-106. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.02.002. Liu T, Xu YY, Chen H, et al. Rabbit model of aspergillus keratitis induced by modified corneal surface lens method [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2011, 29(2): 101-106. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.02.002.
- [10] Gyanfosu L, Koffuor GA, Kyei S, et al. Efficacy and safety of extemporaneously prepared miconazole eye drops in Candida albicans-induced keratomycosis [J]. Int Ophthalmol, 2018, 38(5): 2089-2100. DOI: 10.1007/s10792-017-0707-z.
- [11] 翟华蕾, 谢立信, 董晓光. 明胶酶在兔真菌性角膜炎病理改变中的作用研究[J]. 中华眼科杂志, 2007, 43(9): 817-822. DOI: 10.3760/j.issn:0412-4081.2007.09.012. Zhai HL, Xie LX, Dong XG. The roles of gelatinases in pathological changes of fungal keratitis in experimental rabbits [J]. Chin J Ophthalmol, 2007, 43(9): 817-822. DOI: 10.3760/j.issn:0412-4081.2007.09.012.
- [12] 葛坚, 王宁利. 眼科学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 192.
- [13] Jurkunas U, Behlau I, Colby K. Fungal keratitis: changing pathogens and risk factors [J]. Cornea, 2009, 28(6): 638-643. DOI: 10.1097/ICO.0b013e318191695b.
- [14] Wu J, Zhang WS, Zhao J, et al. Review of clinical and basic approaches of fungal keratitis [J]. Int J Ophthalmol, 2016, 9(11): 1676-1683. DOI: 10.18240/ijo.2016.11.23.
- [15] 中华医学会眼科学分会角膜病学组. 感染性角膜病临床诊疗专家共识(2011年) [J]. 中华眼科杂志, 2012, 48(1): 72-75. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2012.01.019.
- [16] Fernandes M, Vira D, Dey M, et al. Comparison between polymicrobial and fungal keratitis: clinical features, risk factors, and outcome [J]. Am J Ophthalmol, 2015, 160(5): 873-881. e2. DOI: 10.1016/j.ajo.2015.07.028.
- [17] 翟华蕾, 谢立信. 真菌性角膜炎的临床研究进展 [J]. 中华医学杂志, 2007, 87(33): 2372-2374.
- [18] Słowik M, Biernat MM, Urbaniak-Kujda D, et al. Mycotic infections of the eye [J]. Adv Clin Exp Med, 2015, 24(6): 1113-1117. DOI: 10.17219/acem/50572.
- [19] Park HJ, Kim SH, Ju HW, et al. Microplasma Jet arrays as a therapeutic choice for fungal keratitis [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2422. DOI: 10.1038/s41598-018-20854-8.
- [20] Sahariah P, Másson M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: a review of the structure-activity relationship [J]. Biomacromolecules, 2017, 18(11): 3846-3868. DOI: 10.1021/acs.biomac.7b01058.
- [21] 唐大川, 杨红. 壳聚糖神经保护机制研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(3): 281-284. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.03.021. Tang DC, Yang H. Current research of neuroprotective effect of chitosan [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(3): 281-284. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.03.021.
- [22] Matica MA, Aachmann FL, Tøndervik A, et al. Chitosan as a wound dressing starting material; antimicrobial properties and mode of action [J/OL]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23): E5889 [2019-02-11]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31771245. DOI: 10.3390/ijms20235889.
- [23] Wei S, Ching YC, Chuah CH. Synthesis of chitosan aerogels as promising carriers for drug delivery: A review [J/OL]. Carbohydr Polym, 2020, 231: 115744 [2020-01-03]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31888854. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115744.
- [24] Szymańska E, Winnicka K. Stability of chitosan—a challenge for pharmaceutical and biomedical applications [J]. Mar Drugs, 2015, 13(4): 1819-1846. DOI: 10.3390/md13041819.
- [25] Jia R, Duan Y, Fang Q, et al. Pyridine-grafted chitosan derivative as an antifungal agent [J]. Food Chem, 2016, 196: 381-387. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.09.053.
- [26] Wei L, Mi Y, Zhang J, et al. Evaluation of quaternary ammonium chitosan derivatives differing in the length of alkyl side-chain; Synthesis and antifungal activity [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 129: 1127-1132. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.099.
- [27] 段文凯, 吕美巧, 郑春翠, 等. 壳聚糖的结构及抑菌作用 [J]. 现代食品科技, 2006, 22(4): 259-261. Duan WK, Lyu MQ, Zheng CC, et al. The structure of chitosan and its bacteriostatic effect [J]. Modern Food Sci Tech, 2006, 22(4): 259-261.

(收稿日期: 2019-05-11 修回日期: 2020-01-26)

(本文编辑: 张宇)