

· 实验研究 ·

伏立康唑纳米银复合膜对烟曲霉菌性角膜炎的疗效及安全性

钟菁 袁进 蒋刚彪 陈国普 孙弋飏 陈玲 邓宇晴

【摘要】 背景 伏立康唑具有良好的抗真菌活性,但目前临床上所用剂型的生物利用度并不理想。改良伏立康唑眼用剂型并提高药物的生物利用度对于改善真菌性角膜炎的预后,减少药物不良反应具有重要意义。目的 研究伏立康唑纳米银/聚合物复合材料在治疗真菌性角膜炎过程中的缓释作用、药物疗效和安全性。方法 选择 6~8 周龄雌性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 210 只,其中 30 只用于药物的生物相容性验证,180 只小鼠用于疗效观察,均以左眼作为实验眼。药物的生物相容性研究中将 30 只小鼠按照随机数字表法分为正常对照组、纳米银/羧基石墨烯/壳聚糖季铵盐复合物(CS-ETA/Ag/GO)组和包被伏立康唑的纳米银/羧基石墨烯/壳聚糖季铵盐复合物(CS-ETA/Ag/GO/Vor)组,分别将自行构建的 CS-ETA/Ag/GO 膜和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 膜贴敷于小鼠左眼角膜,分别于贴敷后 1 d、7 d 行角膜组织的常规组织病理学检查。药物疗效观察实验中,应用随机数字表法将 180 只小鼠随机分为模型对照组、CS-ETA/Ag/GO 组和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组。3 个组小鼠均用 33G 注射器针头于左眼角膜基质内注射 5×10^7 CFU/ml 烟曲霉菌悬浮液 2.0 μ l 建立烟曲霉菌性角膜炎小鼠模型,CS-ETA/Ag/GO 组和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组小鼠分别在模型眼角膜贴敷相应的药膜。分别于造模后第 1、3、5、7 天用裂隙灯显微镜对术眼角膜炎症进行评分及组织病理学检查,采用真菌平板并计算角膜载菌量;采用 real-time PCR 法检测角膜组织中炎症因子 TNF- α mRNA 和 IL-1 β mRNA 的相对表达量。结果 CS-ETA/Ag/GO 膜和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 膜贴敷于正常小鼠角膜后 1~7 d,经组织病理学检查均未见异常。CS-ETA/Ag/GO/Vor 组各时间点小鼠的角膜炎症评分明显低于模型对照组和 CS-ETA/Ag/GO 组,3 个组间和不同时间点角膜炎症评分的总体差异均有统计学意义($F_{\text{分组}} = 237.29, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 260.33, P = 0.00$)。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,第 7 天部分小鼠角膜穿孔。CS-ETA/Ag/GO 组于造模后角膜炎症表现轻于模型对照组,随造模后时间的延长,角膜炎症逐渐减轻,而各个时间点 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组小鼠角膜炎症反应最为轻微,造模后第 7 天角膜炎症接近痊愈。造模后 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组小鼠角膜载菌量最低,且随着时间延长,载菌量逐渐减少,各组不同时间点角膜载菌量的总体差异比较差异均有统计学意义($F_{\text{分组}} = 113.15, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 126.52, P = 0.00$)。CS-ETA/Ag/GO/Vor 组小鼠角膜中 IL-1 β mRNA 和 TNF- α mRNA 相对表达量均明显低于模型对照组和 CS-ETA/Ag/GO 组,其相对表达量均于造模后第 5 天达峰,第 7 天明显下降。3 个组间小鼠在造模后不同时间点角膜中相对表达量的差异均有统计学意义(IL-1 β : $F_{\text{分组}} = 189.90, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 108.56, P = 0.00$; TNF- α : $F_{\text{分组}} = 82.55, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 44.36, P = 0.00$)。结论 CS-ETA/Ag/GO/Vor 药物缓释膜通过伏立康唑和银离子的协同作用共同抑制真菌活性,减轻真菌诱导的角膜炎症反应。CS-ETA/Ag/GO/Vor 药物缓释膜贴敷于角膜后生物相容性好,未发现角膜组织的毒性反应。

【关键词】 抗真菌药物/治疗; 伏立康唑; 纳米药物; 银/药理学; 烟曲霉菌; 角膜炎; 近交系 C57BL 小鼠

Therapeutic efficacy and safety of nano-silver membrane with voriconazole for *Aspergillus fumigatus* keratitis after topical application Zhong Jing, Yuan Jin, Jiang Gangbiao, Chen Guopu, Sun Yifang, Chen Ling, Deng Yuqing. State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

Corresponding author: Yuan Jin, Email: yuanjincornea@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.05.006

基金项目:国家自然科学基金项目(81270972);中山大学优秀青年教师培训项目(11ykpy66)

作者单位:510060 广州,中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室(钟菁、袁进、孙弋飏、陈玲、邓宇晴);510642 广州,华南农业大学资环学院制药工程系(蒋刚彪、陈国普)

通信作者:袁进,Email: yuanjincornea@126.com

[Abstract] Background Voriconazole is the traditionally used antifungal agent, but its ophthalmic form is unsatisfactory. A novel ophthalmic drug delivery system with biomedical devices may be of promising for the prognosis of fungal keratitis. **Objective** This study was to investigate the sustained release, therapeutic effect and biocompatibility of effect and quaternized chitosan functionalized with carboxylated graphene and nano-silver and voriconazole (CS-ETA/Ag/GO/Vor) for fungal keratitis. **Methods** This study complied with the Regulations for the Administration of Affair Concerning Experimental Animals of State Science and Technology Commission. Two hundred and ten SPF female C57BL/6 mice were selected with the age 6–8 weeks for the biocompatibility experiment (30 mice) and therapeutic observation of CS-ETA/Ag/GO/Vor (180 mice). CS-ETA/Ag/GO and CS-ETA/Ag/GO/Vor were attached on the normal corneas of mice and compared with the normal mice to assess the histopathological changes. *Aspergillus fumigatus*-infected mouse models were established in the left eyes of 180 mice by intrastromally injection of 2.0 μl *Aspergillus fumigatus* suspension with the density of 5×10^7 CFU/ml, then the mice were randomized into the model control group, CS-ETA/Ag/GO group and CS-ETA/Ag/GO/Vor group, and the corresponding membrane were attached the central corneas in different groups. In 1 day, 3, 5, 7 days after modeling, the corneas were examined under the slit lamp microscope and scored, and corneal sections were prepared for the histopathological examination. Fungal activity was confirmed by plate counts, and real-time PCR was employed to assay the relative expressions of interleukin-1 β (IL-1 β) mRNA and tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA in the corneas. **Results** No morphological abnormality was seen in the corneas in the normal control group, CS-ETA/Ag/GO group and CS-ETA/Ag/GO/Vor group. Corneal inflammatory score was significantly lower in the CS-ETA/Ag/GO/Vor group in various time points, with a significant differences among the groups and time points ($F_{\text{group}} = 237.29, P = 0.00; F_{\text{time}} = 260.33, P = 0.00$). The edema, necrosis or perforation of cornea were seen in the model control group, and slighter inflammatory response in the CS-ETA/Ag/GO group, and corneal edema was gradually disappear in the CS-ETA/Ag/GO/Vor group. The corneal fungal loads were highest in the model control group and lowest in the CS-ETA/Ag/GO/Vor group, with significant differences among the three groups and various time points ($F_{\text{group}} = 113.15, P = 0.00; F_{\text{time}} = 126.52, P = 0.00$). The relative expressions of IL-1 β mRNA and TNF- α mRNA in the corneas peaked in the fifth day after modeling in all of the three groups, and the expression levels of IL-1 β mRNA and TNF- α mRNA in the corneas were lowest in the CS-ETA/Ag/GO/Vor group, showing significant differences among the groups and time points (IL-1 β : $F_{\text{group}} = 189.90, P = 0.00; F_{\text{time}} = 108.56, P = 0.00$; TNF- α : $F_{\text{group}} = 82.55, P = 0.00; F_{\text{time}} = 44.36, P = 0.00$). **Conclusions** CS-ETA/Ag/GO/Vor delivery system plays an anti-fungal activity in fungal keratitis by the synergistic effect of voriconazole and Ag⁺. In addition, CS-ETA/Ag/GO/Vor appears to have a good safety after topical application.

[Key words] Antifungal agents/therapeutic use; Voriconazole; Nanomedicine; Silver/pharmacology; *Aspergillus fumigatus*; Keratitis; Mice, inbred C57BL

真菌性角膜炎是一种高致盲率的感染性眼病,在发展中国家及气候温暖或炎热地区发病率高。角膜真菌感染在眼表感染性疾病中占 10.14%^[1],中国的真菌性角膜炎致病菌种以镰刀菌为主,其次为曲霉菌和念珠菌^[2]。随着临床上广谱抗菌素、糖皮质激素及抗病毒药物的广泛使用,中国真菌性角膜炎的发病率逐渐升高,病情也更加严重^[3]。伏立康唑是咪唑类抗真菌药物,通过抑制细菌色素 P450 脱甲基酶及麦角醇合成酶的活性来改变真菌外膜的通透性,全面发挥抗菌作用。各种致病真菌及氟康唑耐药菌株皆对其敏感,比传统抗真菌药物两性霉素 B、伊曲康唑的抗真菌谱更广,其疗效也更为确切,但是口服伏立康唑后患者可有—过性视力下降和色觉异常,对肝功能有一定损害^[4]。配制伏立康唑滴眼液局部应用虽可避免全身并发症,但是生物利用度低,需通过频繁给药以维持眼

表有效药物浓度,因此患者依从性欠佳。研发新的伏立康唑缓释剂型可提高药物的生物利用度。本研究探讨以壳聚糖季铵盐为基质而构建的纳米银/聚合物复合材料负载伏立康唑药物对真菌性角膜炎的疗效。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8 周龄、健康雌性 C57BL/6 小鼠 210 只(南方医科大学动物饲养中心提供),体质量为 18~20 g,均在中山大学中山眼科中心实验动物中心 SPF 动物房饲养和实验。实验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。

1.2 载药复合膜眼表生物相容性验证

按 0.01 ml/kg 的剂量小鼠腹腔内注射水合氯醛麻醉。将 30 只小鼠按照随机数字表法分为正常对照

组、纳米银/羧基石墨烯/壳聚糖季铵盐复合物 (CS-ETA/Ag/GO) (华南农业大学生物制药工程系构建) 组和包被伏立康唑的纳米银/羧基石墨烯/壳聚糖季铵盐复合物 (CS-ETA/Ag/GO/Vor) (华南农业大学生物制药工程系构建) 组。CS-ETA/Ag/GO 组和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组将载药复合膜贴敷于小鼠的左眼角膜上,缝合上下眼睑。分别于贴膜后 1 d、7 d 用裂隙灯显微镜观察小鼠眼表反应,颈椎脱臼法处死小鼠后取左眼角膜进行组织病理学检查。

1.3 真菌性角膜炎模型的建立

烟曲霉菌 (*A. fumigatus* 3.772) 标准菌株 (中国医学科学院微生物所中国医学真菌保藏管理中心) 制成真菌孢子生理盐水悬液,用血细胞计数板行孢子计数,调整真菌孢子含量为 5×10^7 菌落形成单位 (colony forming units, CFU)/ml。按 0.01 ml/g 的剂量小鼠腹腔内注射水合氯醛麻醉。首先使用 30G 针头自小鼠角膜周边进针,形成角膜基质隧道,更换 33G 针头沿隧道进入角膜基质,注射 2.0 μ l 烟曲霉菌悬浮液,然后应用随机数字表法将 180 只小鼠随机分为模型对照组、CS-ETA/Ag/GO 组和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组,每组 60 只。用 CS-ETA/Ag/GO 膜和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 膜贴敷于 CS-ETA/Ag/GO 组和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组小鼠的左眼角膜,3 个组小鼠均缝合上下眼睑。分别于造模后 1、3、5 和 7 d 在裂隙灯显微镜下检查眼前段,各组任意处死 15 只小鼠进行检测,并采用真菌性角膜炎评分系统进行病变严重程度等级评分^[5] (表 1)。

表 1 小鼠真菌性角膜炎的评分标准

角膜症状	1 分	2 分	3 分	4 分
混浊范围	1% - 25%	26% - 50%	51% - 75%	76% - 100%
表面不规则度	轻度不规则	基质水肿,表面隆起或凹陷	基质明显水肿,明显凹陷或者后弹力层膨出	角膜穿孔
混浊度	轻度混浊,虹膜血管及瞳孔清晰可见	中度混浊,瞳孔轮廓可见	不均匀混浊,其后结构不可见	均匀一致的混浊,其后结构不可见

1.4 小鼠角膜组织病理学观察

无菌条件下摘取小鼠左侧眼球,在解剖显微镜下剪取角膜,置于质量分数 4% 多聚甲醛中固定 24 h,脱水、石蜡固定后在靠近角膜中央以矢状位 5 μ m 厚切片。二甲苯脱蜡,苏木精-伊红染色,封片后光学显微镜下观察并拍照。

1.5 角膜真菌平板计数

将感染的角膜模型组织在含有质量分数 0.85%

NaCl 和质量分数 0.25% 牛血清白蛋白的无菌水中用组织研磨棒研磨至肉眼看不见组织为止,破坏角膜以释放真菌,转入 15 ml 离心管后以 9 000 r/min 离心 10 min,离心半径 50 μ m 收集上清,以 10 倍等比稀释样品,涂沙土培养板。每个稀释度涂 3 个平板,28 $^{\circ}$ C 孵箱过夜,第 2 天计数平板菌落。

1.6 实时定量 PCR 检测角膜中炎症因子 mRNA 表达

使用 Trizol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司) 进行小鼠角膜组织裂解,提取 mRNA,通过 NanoDrop 2000C 分光光度测定仪 (美国 Thermo Scientific 公司) 对白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) mRNA 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) mRNA 进行定量检测。将 mRNA 逆转录为 cDNA 后,以 cDNA 为模板,通过 SYBR Green Master Mix (美国 Bio-Rad 公司) 反应体系进行扩增检测 IL-1 β mRNA 和 TNF- α mRNA 表达水平。以 β -actin 为内参,上游引物为 5'-GATTACTGCTCTGGCTCCTAGC-3',下游引物为 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGC-3'; IL-1 β 上游引物为 5'-CGCAGCAGCACATCAACAGAGC-3',下游引物为 5'-TGTCCTCATCTGGAGGTCCACG-3'; TNF- α 上游引物为 5'-CACAGAAAGCATGATCCGCGAC-3',下游引物为 5'-TGCCACAAGCAGGAATGAGAAGAG-3'。在 Step One 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司) 上扩增。相对基因表达水平用 Ct 值比较法 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算转录水平差异。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验均呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间方差经 Levene 检验证实方差齐 (均 $P > 0.05$)。采用完全随机分组多水平实验设计,3 个组间在不同时间点各检测指标数据资料的总体差异比较均采用重复测量两因素方差分析,多重比较采用 LSD- t 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 载药复合膜的眼表生物相容性

自行构建的 CS-ETA/Ag/GO 膜和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 膜外观半透明,柔软可弯曲。裂隙灯显微镜下观察可见贴敷生物膜后,各组小鼠角膜透明,未见炎性细胞浸润,无新生血管,贴敷生物膜后第 7 天角膜上的生物膜溶解吸收。角膜组织病理学检查显示,各组小鼠角膜植片无水肿,基质纤维排列整齐,未见炎性细胞浸润 (图 1)。

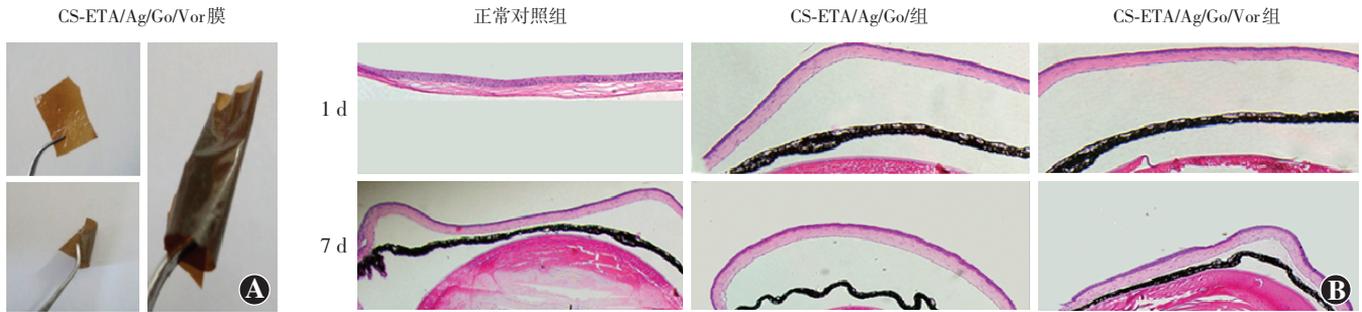


图 1 载药复合膜角膜生物相容性评估 (HE ×200) A:CS-ETA/Ag/GO/Vor 膜在平铺、折叠和卷曲 3 种状态下的外观 B:CS-ETA/Ag/GO 膜和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 膜贴敷角膜表面后 1 d 及 7 d,角膜厚度正常与正常对照组无差异,未见炎性细胞浸润

2.2 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,真菌性角膜炎造模后第 1 天,3 个组均出现角膜基质浸润,模型对照组病灶范围大于 CS-ETA/Ag/GO 组和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组。感染后第 3 天,模型对照组的角膜病灶扩大,角膜水肿加重,造模后第 5 天周边角膜基质水肿,1 只小鼠角膜穿孔。在相应时间点,CS-ETA/Ag/GO 组小鼠角膜仅有小面积浸润,CS-ETA/Ag/GO/Vor 组的病灶范围小于 CS-ETA/Ag/GO 组,炎症反应更轻微。造模后第 7 天,模型对照组角膜基质病灶累及全层,前房可见白色絮状渗出,结膜充血。CS-ETA/Ag/GO 组角膜病灶范围逐渐缩小,角膜水肿减轻;CS-ETA/Ag/GO/Vor 组结膜充血减轻,浸润范围显著缩小(图 2)。3 个组小鼠造模后早期角膜均呈现随感染时间延长炎症评分增加的趋势,感染后第 5 天炎症评分最高,此后逐渐下降。其中感染后第 1 天,CS-ETA/Ag/GO 组和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组角膜炎症评分明显低于模型对照组,差异均有统计学意义 ($t = 3.47, P < 0.01; t = 6.35, P < 0.01$)。感染后第 3 天,各组小鼠角膜炎症评分均升高,以模型对照组增加最明显,CS-ETA/Ag/GO/Vor 组评分低于 CS-ETA/Ag/GO 组和模型对照组,差异均有统计学意义 ($t = 2.89, P < 0.05; t = 8.66, P < 0.01$)。造模后第 5 天,模型对照组角膜炎症反应达高峰,评分均为 11.0 分,CS-ETA/Ag/GO 组和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组小鼠角膜炎症评分均值分别增加至 7.6 分和 5.6 分,模型对照组小鼠角膜炎症评分明显高于 CS-ETA/Ag/GO 组和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组,差异均有统计学意义 ($t = 13.28, P < 0.01; t = 11.32, P < 0.01$)。造模后第 7 天,模型对照组小鼠角膜炎症评分均值稍有下降,但 CS-ETA/Ag/GO 组和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组明显降低,其中 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组较 CS-ETA/Ag/GO 组和模型对照组角膜炎症评分下降,差异均有统计学意义 ($t = 5.72, P < 0.01; t = 16.00, P < 0.01$) (表 2)。

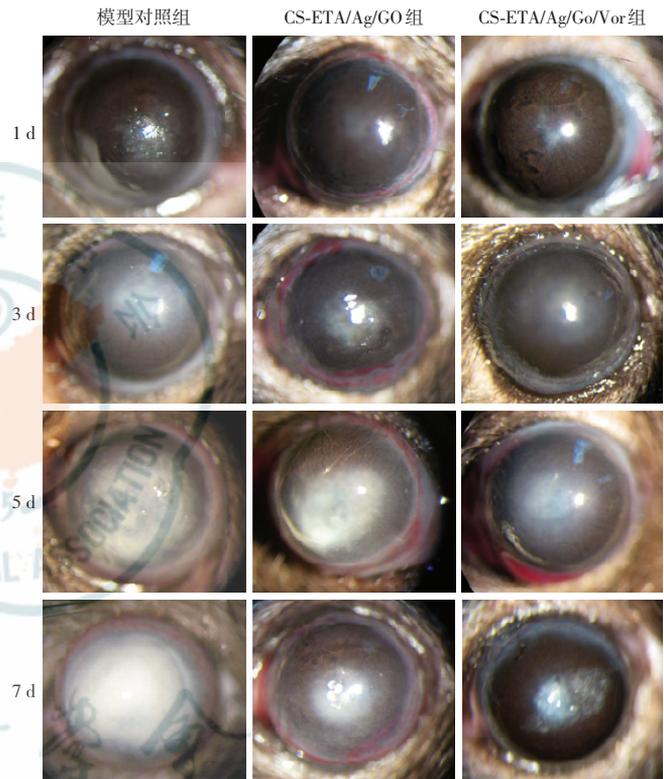


图 2 各组小鼠裂隙灯显微镜下角膜炎表现 (×16) 模型对照组随造模时间延长,角膜溃疡逐渐加重,CS-ETA/Ag/GO 组在相应时间点角膜浸润程度轻于模型对照组,而 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组角膜感染程度低于其他组 CS-ETA/Ag/GO: 纳米银/羧基石墨烯/壳聚糖季铵盐复合物膜;CS-ETA/Ag/GO/Vor: 包被伏立康唑的纳米银/羧基石墨烯/壳聚糖季铵盐复合物膜

表 2 不同时间点各组角膜炎症评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同时间点角膜炎症评分			
		1 d	3 d	5 d	7 d
模型对照组	5	3.60±0.55	5.60±0.55	11.80±0.45	10.40±0.55
CS-ETA/Ag/GO 组	5	2.40±0.55 ^a	3.60±0.55 ^a	7.60±0.55 ^a	6.80±0.84 ^a
CS-ETA/Ag/GO/Vor 组	5	1.40±0.55 ^{ab}	2.60±0.55 ^{ab}	5.60±1.14 ^{ac}	4.00±0.71 ^{ac}

注: $F_{\text{分组}} = 237.29, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 260.33, P = 0.00$ 。与各自的模型对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 CS-ETA/Ag/GO 组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ (重复测量两因素方差分析, LSD- t 检验) CS-ETA/Ag/GO: 纳米银/羧基石墨烯/壳聚糖季铵盐复合物膜;CS-ETA/Ag/GO/Vor: 包被伏立康唑的纳米银/羧基石墨烯/壳聚糖季铵盐复合物膜

2.3 各组小鼠角膜组织病理学表现

角膜组织病理学检查显示,模型对照组小鼠角膜水肿,角膜上皮大部分缺失,部分角膜基质溶解坏死,造模后第 3 天角膜基质纤维断裂,大量炎性细胞浸润,造模后第 5 天炎性细胞浸润波及角膜全层,第 7 天部分小鼠角膜穿孔,虹膜脱出。CS-ETA/Ag/GO 组于造模后第 1 天角膜水肿较轻,基质溶解和炎性浸润程度轻,至第 5 天浸润达深基质层但未出现角膜穿孔,随后炎性改变逐渐减轻。各个时间点 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组小鼠角膜水肿程度、基质内炎性浸润范围以及炎性细胞数量均明显轻于模型对照组和 CS-ETA/Ag/GO 组,造模后第 7 天角膜接近痊愈(图 3)。

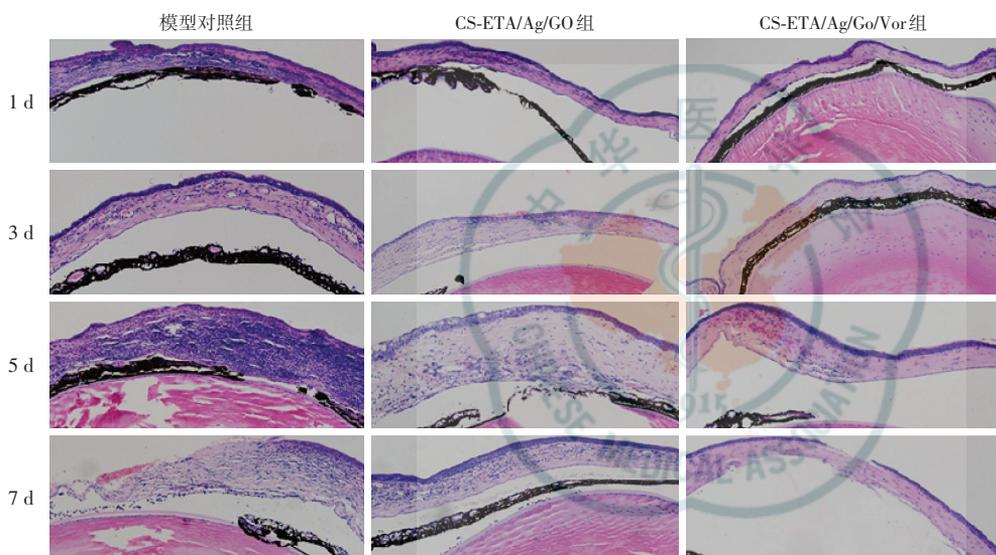


图 3 各组小鼠角膜组织病理学表现(HE ×200) 模型对照组造模后小鼠角膜炎性浸润和水肿程度明显加重,造模后第 7 天可见角膜穿孔;CS-ETA/Ag/GO 组在造模后第 5 天角膜水肿明显,但浸润程度轻于模型对照组,造模后各时间点 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组小鼠角膜损伤程度最轻 CS-ETA/Ag/GO:纳米银/羧基石墨烯/壳聚糖季铵盐复合物膜;CS-ETA/Ag/GO/Vor:包被伏立康唑的纳米银/羧基石墨烯/壳聚糖季铵盐复合物膜

2.4 各组小鼠角膜内活性真菌计数

用平板计数法检测感染后小鼠角膜内真菌活性,各组小鼠随着造模后时间延长角膜内活性真菌量均明显减少,其中 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组角膜内活性真菌量减少最明显,在各时间点均低于模型对照组和 CS-ETA/Ag/GO 组。造模后第 1 天,模型对照组菌载量为 $(49.33 \pm 3.06) \times 10^3$ CFU/ml,明显高于 CS-ETA/Ag/GO 组和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组,差异均有统计学意义($t=6.01, P<0.01$; $t=15.31, P<0.01$),至造模后第 3 天,模型对照组降至 $(36.00 \pm 2.00) \times 10^3$ CFU/ml,明显高于 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组,差异有统计学意义($t=11.07, P<0.01$)。造模后第 7 天,3 个组角膜内活性真菌量均降至最低,但 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组均少于 CS-ETA/Ag/GO 组和模型对照组,差异均有统计学

意义($t=2.78, P<0.05$; $t=6.92, P<0.01$)(表 3)。

表 3 各组不同时间点角膜载菌量的比较($\bar{x} \pm s, \times 10^3$)

组别	样本量	不同时间点角膜内活性真菌量			
		1 d	3 d	5 d	7 d
模型对照组	3	49.33±3.06	36.00±2.00	22.67±4.16	7.63±0.81
CS-ETA/Ag/GO 组	3	29.00±5.00 ^a	25.00±5.57 ^b	13.67±3.21 ^b	4.73±0.80 ^b
CS-ETA/Ag/GO/Vor 组	3	16.67±2.08 ^{ac}	12.67±3.06 ^{ac}	7.67±1.53 ^{ac}	2.80±0.90 ^{ac}

注: $F_{\text{分组}}=113.15, P=0.00$; $F_{\text{时间}}=126.52, P=0.00$ 。与各自的模型对照组比较, ^a $P<0.01$, ^b $P<0.05$; 与 CS-ETA/Ag/GO 组比较, ^c $P<0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD- t 检验) CFU: 菌落形成单位; CS-ETA/Ag/GO: 纳米银/羧基石墨烯/壳聚糖季铵盐复合物膜; CS-ETA/Ag/GO/Vor: 包被伏立康唑的纳米银/羧基石墨烯/壳聚糖季铵盐复合物膜

2.5 各组小鼠角膜组织中炎性因子 TNF- α mRNA 和 IL-1 β mRNA 的相对表达

模型对照组、CS-ETA/Ag/GO 组和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组小鼠角膜组织中 IL-1 β mRNA 和 TNF- α mRNA 的相对表达均随着造模时间的延长而逐渐增加,造模后第 3 天和第 5 天,小鼠角膜组织中 IL-1 β mRNA 和 TNF- α mRNA 的相对表达增加幅度最大,造模后第 5 天达高峰,造模后第 7 天其相对表达量下降,但仍高于造模后第 1 天,其中模型对照组炎性因子表达水平最高,

CS-ETA/Ag/GO/Vor 组最低。造模后第 1 天,模型对照组小鼠角膜组织中 IL-1 β mRNA 和 TNF- α mRNA 的表达高于 CS-ETA/Ag/GO 组和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组,差异均有统计学意义(IL-1 β : $t=3.57, P<0.05$; $t=11.01, P<0.01$. TNF- α : $t=3.66, P<0.05$; $t=6.29, P<0.01$)。造模后第 3 天,各组中 IL-1 β mRNA 和 TNF- α mRNA 的相对表达均明显增加,但 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组增加量最少。第 5 天,IL-1 β mRNA 和 TNF- α mRNA 表达最高,其中 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组明显低于 CS-ETA/Ag/GO 组和模型对照组,差异均有统计学意义(IL-1 β : $t=3.14, P<0.05$; $t=16.92, P<0.01$. TNF- α : $t=3.21, P<0.05$; $t=6.04, P<0.01$)(表 4,5)。

表 4 各组在造模后不同时间点角膜中 IL-1 β mRNA 的相对表达水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	不同时间点 IL-1 β mRNA 相对表达量			
		1 d	3 d	5 d	7 d
模型对照组	3	61.88 \pm 6.36	98.20 \pm 9.89	182.85 \pm 11.50	87.72 \pm 5.19
CS-ETA/Ag/GO 组	3	36.21 \pm 10.7 ^a	73.14 \pm 4.80 ^a	86.04 \pm 12.63 ^b	60.30 \pm 13.35 ^b
CS-ETA/Ag/GO/Vor 组	3	16.42 \pm 3.27 ^{bc}	48.04 \pm 6.13 ^{bd}	61.88 \pm 4.60 ^{ac}	29.98 \pm 8.50 ^{bc}

注: $F_{\text{分组}} = 189.90, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 108.56, P = 0.00$. 与模型对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 CS-ETA/Ag/GO 组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ (重复测量两因素方差分析, LSD- t 检验) IL: 白细胞介素; CS-ETA/Ag/GO: 纳米银/羧基石墨烯/壳聚糖季铵盐复合物膜; CS-ETA/Ag/GO/Vor: 包被伏立康唑的纳米银/羧基石墨烯/壳聚糖季铵盐复合物膜

表 5 各组在造模后不同时间点角膜中 TNF- α mRNA 的相对表达水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	不同时间点角膜内 TNF- α mRNA 相对表达量			
		1 d	3 d	5 d	7 d
模型对照组	3	32.68 \pm 6.50	66.44 \pm 11.52	94.98 \pm 11.78	61.01 \pm 16.06
CS-ETA/Ag/GO 组	3	17.21 \pm 3.38 ^a	27.24 \pm 5.12 ^b	63.10 \pm 7.81 ^a	33.75 \pm 3.86 ^a
CS-ETA/Ag/GO/Vor 组	3	8.42 \pm 1.59 ^{bc}	16.17 \pm 2.95 ^{bc}	37.02 \pm 11.73 ^{bc}	17.81 \pm 5.62 ^{bc}

注: $F_{\text{分组}} = 82.55, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 44.36, P = 0.00$. 与模型对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 CS-ETA/Ag/GO 组比较, ^c $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD- t 检验) TNF: 肿瘤坏死因子; CS-ETA/Ag/GO: 纳米银/羧基石墨烯/壳聚糖季铵盐复合物膜; CS-ETA/Ag/GO/Vor: 包被伏立康唑的纳米银/羧基石墨烯/壳聚糖季铵盐复合物膜

3 讨论

真菌性角膜炎是严重的致盲眼病,目前临床上尚缺乏特效的抗真菌药物。伏立康唑是一种新型的咪唑类抗真菌药物,抗真菌谱广,被 FDA 批准应用于严重的曲霉菌、足放线菌和镰孢菌感染的治疗,但由于伏立康唑为脂溶性药物^[6],目前用于治疗真菌性角膜炎的主要给药途径仍为全身用药或玻璃体腔注射,因此存在诱发玻璃体出血或者眼内炎的风险^[7]。此外,伏立康唑在全身用药治疗过程中存在一些不良反应,常见的包括神经功能障碍、视觉障碍、肝功能异常、肾功能衰竭等^[8]。目前中国已有配制伏立康唑滴眼液报道,但配制成的滴眼液保质期短、药物释放曲线不稳定,生物利用度低^[6]。新型药物缓释系统可提高药物的生物利用度,能缓释控释药物,受到了广泛关注^[9]。本研究中合成了壳聚糖季铵盐基质的纳米银/聚合物复合材料,耦合石墨烯负载伏立康唑后制成具有强化抗真菌作用的新型药物缓释系统。

银离子已用于医疗领域多年,研究表明银可以抑制人类免疫缺陷病毒与宿主细胞结合,抑制血小板的聚集,也用于过滤水和空气中的微生物^[10-12]。纳米银可能通过附着在细胞膜的表面阻断细胞的通透性和呼

吸功能,或者与微生物膜表面反应,穿透进入微生物体内,从而起到抑菌和杀菌作用^[13]。壳聚糖的季铵化引入了季铵盐基团,改善了由于壳聚糖大分子的规整性及分子链间强烈的氢键作用导致的机械性能较差、稳定性不好、溶解性能差等缺点,因此具有良好的抗菌活性、吸湿保湿性、生物相容性、成膜性和可生物降解性^[10]。本实验将 CS-ETA/Ag/GO 膜和 CS-ETA/Ag/GO/Vor 膜贴敷于真菌感染的小鼠角膜,贴敷 1 周未见角膜组织炎症反应及新生血管形成,呈现较好的活体组织相容性。本研究使用的药物缓释系统将具有抑菌性能的纳米银与抗真菌药物组合,增强了药物的抗真菌效能。该载药膜的药物负载量大,缓释时间长,可制作成柔软且易于贴敷于角膜的膜,避免了全身用药的不良反应及眼部频繁给药带来的不便。

本研究通过对角膜溃疡面积、角膜浸润程度来评定烟曲霉菌小鼠动物模型角膜炎的转归。复合载药材料 CS-ETA/Ag/GO 对真菌感染有一定的抑制作用,研究发现 CS-ETA/Ag/GO 组小鼠的角膜溃疡面积和角膜水肿较模型对照组减轻,可能与 CS-ETA 和释放的 Ag⁺ 所表现的抑菌活性有关,提示 CS-ETA/Ag/GO 材料本身可发挥拮抗真菌性角膜炎的作用。CS-ETA/Ag/GO 材料的药物缓释系统联合伏立康唑后治疗效果更为明显,角膜炎评分明显降低,且随用药时间延长,CS-ETA/Ag/GO/Vor 组角膜病变逐渐愈合,而在模型对照组角膜病变随时间延长逐渐加重,甚至出现穿孔。组织病理学研究表明,CS-ETA/Ag/GO/Vor 组的角膜水肿和浸润程度最低,角膜内真菌量明显减少,CS-ETA/Ag/GO 组角膜病变和角膜内活性真菌量少于 CS-ETA/Ag/GO/Vor 组,但明显多于模型对照组,其可能的机制为 CS-ETA/Ag/GO/Vor 生物膜负载有纳米银及抗菌药物伏立康唑 2 种抗菌成分,可发挥协同作用:一方面伏立康唑可抑制麦角醇合成酶的活性,改变真菌外膜的通透性,抑制真菌活性,引入纳米银后,Ag⁺ 进入到微生物细胞质后与 DNA 结合,抑制其复制和转录,进而抑制微生物的生长,起到协同增强的抗菌效果^[14];另一方面载药系统贴敷在眼表缓释药物并逐渐降解,维持眼表有效药物浓度,降低真菌感染复发的风险。

真菌侵袭角膜组织后启动机体的天然免疫而发生炎症反应,TNF- α 和 IL-1 β 是重要的促炎因子,主要由巨噬细胞、中性粒细胞及其他组织释放,可趋化激活中性粒细胞,促进多种炎症介质的合成和释放,并加重炎症反应^[15]。在真菌性角膜炎中,随着感染时间的延长和炎症程度的加重,TNF- α 和 IL-1 β 在炎症反应组织

中的表达逐渐上调^[16-17]。本研究结果发现,真菌感染后小鼠角膜中 TNF- α 和 IL-1 β 表达量明显升高,感染后第 5 天角膜炎症反应最重,炎症因子的表达也达到高峰,其表达规律与病情进展程度一致。CS-ETA/Ag/GO/Vor 组小鼠角膜中炎症因子在各个时间点的表达均低于 CS-ETA/Ag/GO 组和模型对照组,提示 CS-ETA/Ag/GO/Vor 能有效抑制真菌的活性。当真菌侵袭眼表时,眼表中的天然免疫启动模式识别受体通过识别真菌细胞壁的成分,激活细胞内信号通路,上调炎症反应,从而增加炎症因子和趋化因子的产生^[15]。CS-ETA/Ag/GO/Vor 通过抑制真菌活性和以下途径减轻角膜真菌感染后过度的炎症反应:(1)减少炎症细胞浸润。(2)抑制已浸润的炎症细胞释放炎症因子。(3)减少角膜固有细胞合成并释放 TNF- α 和 IL-1 β 。因此 CS-ETA/Ag/GO/Vor 通过直接和间接抑制和清除真菌,使真菌的侵袭力下降,减少炎症因子的释放,减轻病情进展,促进感染愈合。

综上所述,本研究中使用的复合型 CS-ETA/Ag/GO/Vor 缓释载药系统具有协同抑菌作用,提高伏立康唑的眼部生物利用度,协同增强抗真菌活性,减轻感染性炎症,改善真菌性角膜炎的预后,为真菌性角膜炎的药物治疗提供了新的途径。

参考文献

- [1] Cao J, Yang Y, Yang W, et al. Prevalence of infectious keratitis in Central China [J/OL]. BMC Ophthalmol, 2014, 14 : 43 [2014-12-18]. <http://www.biomedcentral.com/1471-2415/14/43>. doi: 10.1186/1471-2415-14-43.
- [2] 李绍伟, 谢立信, 晋秀明, 等. 严重真菌性角膜炎患者就诊史调查分析 [J]. 中华眼科杂志, 2003, 39(5) : 274-277. doi: 10.3760/j.issn.0412-4081.2003.05.006.
- [3] Thomas PA, Kalliamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management [J]. Clin Microbiol Infect, 2013, 19(3) : 210-220. doi: 10.1111/1469-0691.12126.
- [4] Troke P, Obenga G, Gaujoux T, et al. The efficacy of voriconazole in 24 ocular Fusarium infections [J]. Infection, 2013, 41(1) : 15-20. doi: 10.1007/s15010-012-0273-2.
- [5] Wu TG, Wilhelmus KR, Mitchell BM. Experimental keratomycosis in a mouse model [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(1) : 210-216. doi: 10.1167/iovs.02-0446.
- [6] 刘美欣, 高翔, 刘彤, 等. 伏立康唑滴眼液的处方优化及质量控制 [J]. 中国药房, 2012, 23(5) : 430-433. doi: 10.6039/j.issn.1001-0408.2012.05.17.
- [7] Hariprasad SM, Mieler WF, Lin TK, et al. Voriconazole in the treatment of fungal eye infections: a review of current literature [J]. Br J Ophthalmol, 2008, 92(7) : 871-878. doi: 10.1136/bjo.2007.136515.
- [8] 朱萍, 蒋正立. 伏立康唑的不良不良反应综述 [J]. 中国药业, 2011, 20(23) : 95-96. doi: 10.3969/j.issn.1006-4931.2011.23.063.
- [9] Das S, Suresh PK. Nanosuspension; a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to amphotericin B [J]. Nanomedicine, 2011, 7(2) : 242-247. doi: 10.1016/j.nano.2010.07.003.
- [10] Lee HY, Park HK, Lee YM, et al. A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial valuation for biomedical applications [J]. Chem Commun, 2007, 28(28) : 2959-2961. doi: 10.1039/B703034G.
- [11] Shrivastava S, Bera T, Singh SK, et al. Characterization of antiplatelet properties of silver nanoparticles [J]. ACS Nano, 2009, 3(6) : 1357-1364. doi: 10.1021/nn900277t.
- [12] Chou W, Yu D, Yang M. The preparation and characterization of silver-loading cellulose acetate hollow fiber membrane for water treatment [J]. Polymers for Advanced Technologies, 2005, 16(8) : 600-607.
- [13] Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles [J]. Nanotechnology, 2005, 16(10) : 2346-2353. doi: 10.1002/pat.630.
- [14] Percival SL, Bowler PG, Russell D. Bacterial resistance to silver in wound care [J]. J Hosp Infect, 2005, 60(1) : 1-7.
- [15] Brown GD. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes [J]. Annu Rev Immunol, 2011, 29 : 1-21. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101229.
- [16] Leal SM Jr, Pearlman E. The role of cytokines and pathogen recognition molecules in fungal keratitis-Insights from human disease and animal models [J]. Cytokine, 2012, 58(1) : 107-111. doi: 10.1016/j.cyt.2011.12.022.
- [17] Huang W, Ling S, Jia X, et al. Tacrolimus (FK506) suppresses TREM-1 expression at an early but not at a late stage in a murine model of fungal keratitis [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(12) : e114386 [2014-12-15]. <http://journals.plos.org/plosone/article?doi=10.1371/journal.pone.0114386>. doi: 10.1371/journal.pone.0114386.

(收稿日期: 2015-01-15)

(本文编辑: 尹卫靖)

读者 · 作者 · 编者

本刊投稿方式

投稿请登陆中华医学会网站 (<http://www.cma.org.cn>), 登录后点击“业务中心”, 经中华医学会远程稿件处理系统 (<http://www.cma.org.cn/ywzx/index.html>) 或中华医学会杂志社网站 (<http://www.medline.org.cn/>), 根据提示进行注册后投稿。投稿时请使用 Word 格式 (.doc 文件类型), 投稿后请注意自留原稿, 并保留论文相关的原始资料, 以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”, 填写有关项目并请每位作者亲笔签字, 加盖单位公章后寄 2 份至本刊编辑部, 其中作者签名顺序和作者单位著录名称应与投稿时文章中著录的相一致, 如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意: (1) 在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章、已用非中文文字期刊发表的文稿不属于一稿两投, 但投稿时应向编辑部说明, 非中文文字期刊已发表的文稿须征得首次发表期刊的同意。(2) 作者须告知与该研究有关的利益冲突, 如该研究被某机构资金资助的声明或与审稿人的利益关系。(3) 如涉及保密问题, 需附有关部门审查同意发表的证明。

(本刊编辑部)