

· 实验研究 ·

胍乙啶对兔 MRSA 眼内炎的预防保护作用

梁倩¹ 邵征² 樊峥³ 王维娜⁴ 黄钰森⁴¹青岛大学医学院, 青岛 266000; ²山东第一医科大学附属眼科研究所, 青岛 266000; ³河北省眼科医院, 邢台 054000; ⁴山东第一医科大学附属青岛眼科医院, 青岛 266000

通信作者: 黄钰森, Email: huang_yusen@126.com

【摘要】 目的 建立兔耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)眼内炎模型并探究交感神经抑制剂胍乙啶对眼内炎炎症反应的调控作用。**方法** 选取 2.5 kg 左右雄性新西兰白兔 6 只, 玻璃体内分别注射 1.5×10^4 、 1.5×10^5 菌落形成单位(CFU) MRSA 细菌悬液 50 μ l, 每组 3 只, 筛选 MRSA 眼内炎模型的稳定感染浓度。另取新西兰白兔 36 只, 采用随机数表法将其分为对照组、地塞米松组、胍乙啶组和预防用药组, 每组 9 只。其中对照组、地塞米松组、胍乙啶组单眼建模 1 d 后玻璃体内分别注射无菌生理盐水、4 mg/ml 地塞米松磷酸钠注射液、5 mg/ml 胍乙啶 50 μ l, 预防用药组建模前 1 h 玻璃体内注射 5 mg/ml 胍乙啶 50 μ l, 后续用药同胍乙啶组, 从成功建模后第 1 天开始隔天分组进行药物治疗。建模后第 1、3、5、7、9、11 天, 采用裂隙灯显微镜观察各组炎症反应并进行炎症评分。建模后第 1、3、5 天, 采用标准梯度稀释法和细菌平板计数法测定各组眼内细菌载量。建模后第 5 天, 采用苏木精-伊红染色法观察各组眼组织结构。采用胍乙啶体外抑菌实验观察各组 MRSA 生长情况。**结果** 兔眼玻璃体内注射 1.5×10^4 CFU MRSA 可得到表型稳定的 MRSA 眼内炎模型。建模后对照组炎症持续进展, 角膜混浊, 角膜血管翳形成, 眼底红光反射消失形成黄色混浊; 地塞米松组眼前节炎症较轻, 后段炎症逐渐进展, 红光反射消失; 胍乙啶组虹膜血管持续充血膨隆; 预防用药组炎症最轻, 角膜清澈透明, 红光反射良好。各组建模后不同时间点炎症评分总体比较差异有统计学意义($F_{\text{组别}} = 20.72, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 9.66, P < 0.001$), 其中预防用药组第 3、9、11 天炎症评分均小于相应时间点对照组、地塞米松组和胍乙啶组, 预防用药组第 7 天炎症评分小于相应时间点对照组, 地塞米松组和胍乙啶组第 9 天炎症评分均小于相应时间点对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与组内第 1 天相比, 对照组第 7、9、11 天炎症评分均显著上升, 地塞米松组第 3、11 天炎症评分显著升高, 胍乙啶组仅第 11 天炎症评分升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。建模后第 1、3、5 天, 对照组、地塞米松组、胍乙啶组均出现大量金黄色菌落, 预防用药组无菌落生长。各组建模后不同时间点 CFU 总体比较差异有统计学意义($F_{\text{组别}} = 15.73, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 9.45, P < 0.001$), 其中预防用药组第 3、5 天 CFU 均小于相应时间点地塞米松组, 地塞米松组第 5 天 CFU 均大于相应时间点对照组和胍乙啶组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 地塞米松组建模后 CFU 持续上升, 第 1、3、5 天 CFU 两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。建模后第 5 天, 对照组和地塞米松组可见大量炎性渗出及炎症细胞浸润, 视网膜结构破坏严重。胍乙啶组炎症细胞浸润及渗出减少, 视网膜各分层依稀可见。预防用药组视网膜结构完整, 未见明显渗出和炎症细胞浸润。胍乙啶体外抑菌实验中, 对照组 MRSA 于 6 h 开始进入对数生长期, 16 h 达高峰。胍乙啶组细菌生长情况和头孢唑林组相似, 细菌悬液吸光度值始终处于较低水平, 位于 0 附近。**结论** 预防使用交感神经抑制剂胍乙啶可有效减轻 MRSA 感染后的眼内炎症反应、炎症细胞浸润及视网膜组织结构损伤。

【关键词】 眼内炎; 细菌性; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 炎症反应; 交感神经抑制剂; 胍乙啶**基金项目:** 国家自然科学基金(82171027); 泰山学者特聘专家(ts20190983)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20240612-00150

Preventive and protective effects of guanethidine against MRSA endophthalmitis in rabbits

Liang Qian¹, Shao Zheng², Fan Zheng³, Wang Weina⁴, Huang Yusen⁴¹School of Medicine, Qingdao University, Qingdao 266000, China; ²Institute of Ophthalmology, Shandong First Medical University, Qingdao 266000, China; ³Hebei Provincial Eye Hospital, Xingtai 054000, China; ⁴Qingdao Eye Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Qingdao 266000, China

Corresponding author: Huang Yusen, Email: huang_yusen@126.com

【Abstract】 Objective To establish a rabbit model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

endophthalmitis and to investigate the regulatory effects of the sympatholytic agent guanethidine on the inflammatory response in endophthalmitis. **Methods** Six male New Zealand white rabbits of about 2.5 kg were selected and injected intravitreally with 50 μ l of the MRSA bacterial suspension containing 1.5×10^4 and 1.5×10^5 colony forming units (CFU), respectively, with 3 rabbits in each group to establish the stable infection concentration for the MRSA endophthalmitis model. Additionally, thirty-six New Zealand white rabbits were included and randomly divided into control group, dexamethasone group, guanethidine group and prophylactic treatment group, with 9 rabbits in each group. The control group, the dexamethasone group, and the guanethidine group were injected with 50 μ l of sterile physiological saline, 4 mg/ml dexamethasone sodium phosphate injection, and 5 mg/ml guanethidine, intravitreally 1 day after unilateral modeling, respectively. The prophylactic treatment group was injected with 50 μ l of 5 mg/ml guanethidine intravitreally one hour before modeling. The subsequent treatments were identical to those in the guanethidine group. Drug treatment was administered on alternate days starting on day 1 after successful modeling. On days 1, 3, 5, 7, 9, and 11 after modeling, the inflammatory reactions of each group were observed and scored using a slit lamp microscope. On days 1, 3 and 5 after modeling, the intraocular bacterial load of each group was measured using standard gradient dilution method and bacterial plate counting method. On day 5 after modeling, the ocular tissue structure of each group was observed by hematoxylin-eosin staining. The growth of MRSA in each group was observed by the *in vitro* antibacterial test of guanethidine. Animal experiments were conducted in strict accordance with the Statement on the Use of Animals in Vision and Ophthalmic Research issued by the Association for Research in Vision and Ophthalmology and were approved by the Ethics Committee of Qingdao Eye Hospital, Affiliated to Shandong First Medical University (No. SDSYKYJS-20210419). **Results** Intravitreal injection of 1.5×10^4 CFU of MRSA into rabbit eyes resulted in a phenotypically stable model of MRSA endophthalmitis. After modeling, in the control group, inflammation continued to progress, leading to corneal opacity, the formation of corneal neovascularization, and the disappearance of the red reflex in the fundus, replaced by yellow opacity. In the dexamethasone group, inflammation in the anterior segment was milder, while inflammation in the posterior segment gradually progressed, and the red reflex disappeared. In the guanethidine group, the iris vessels persistently congested and swelled. The prophylactic treatment group exhibited the mildest inflammation, with a clear and transparent cornea and a good red reflex. There was a statistically significant overall difference in inflammation scores at different time points after modeling among various groups ($F_{\text{group}} = 20.72$, $P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 9.66$, $P < 0.001$). Specifically, the inflammation scores in the prophylactic treatment group on days 3, 9 and 11 were all lower than those in the control group, dexamethasone group and guanethidine group at the corresponding time points, the inflammation scores in the prophylactic treatment group on day 7 were lower than those in the control group at the corresponding time points, the inflammation scores in the dexamethasone group and methamphetamine group on day 9 were lower than those in the control group at the corresponding time points, showing statistically significant differences (all $P < 0.05$). Compared with the first day within the group, the inflammation scores in the control group increased significantly on days 7, 9, and 11, the inflammation scores in the dexamethasone group increased significantly on days 3 and 11, and the inflammation scores in the mezzanine group increased only on day 11, with statistically significant differences (all $P < 0.05$). On days 1, 3, and 5 after modeling, abundant *Staphylococcus aureus* colonies appeared in the control, dexamethasone, and guanethidine groups, while the prophylactic treatment group remained free of colony growth throughout the experiment. There was a significant overall difference in CFU at different time points after modeling across groups ($F_{\text{group}} = 15.73$, $P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 9.45$, $P < 0.001$). Specifically, the CFU on days 3 and 5 in the preventive treatment group were lower than that in the dexamethasone group at the corresponding time points, and the CFU on day 5 in the dexamethasone group were higher than that in the control group and the guanethidine group at the corresponding time points, with statistically significant differences (all $P < 0.05$). CFU in the dexamethasone group continued to increase after modeling, and there were significant pairwise differences in the comparison of CFU on days 1, 3 and 5 (all $P < 0.05$). On day 5 after modeling, inflammatory exudate and inflammatory cell infiltration, with severe destruction of retinal structure were observed in the control and dexamethasone groups. In the guanethidine group, inflammatory cell infiltration and exudate were reduced, and the various retinal layers were faintly visible. In the prophylactic treatment group, the retinal structure remained intact, with no obvious exudate or inflammatory cell infiltration. In the *in vitro* antibacterial assay of guanethidine, MRSA in the control group entered the logarithmic growth phase at 6 hours and reached a peak at 16 hours. Bacterial growth in

the guanethidine group was similar to that in the cefuroxime group, with the absorbance values of the bacterial suspensions remaining at a low level, near 0, throughout the experiment. **Conclusions** Prophylactic use of the sympatholytic agent guanethidine effectively reduces intraocular inflammatory responses, inflammatory cell infiltration, and damage to retinal tissue structure following MRSA infection.

[Key words] Endophthalmitis, bacterial; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Inflammatory response; Sympathoinhibitor; Guanethidine

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82170127); Taishan Scholar Distinguished Expert (ts20190983)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20240612-00150

眼内炎是指发生在玻璃体和/或房水中的严重感染性眼病,常见于内眼手术后、眼球穿通伤后或玻璃体注射术后,病情进展迅速,若未及时干预可能造成不可逆性视力损伤,甚至致盲,需行眼球摘除术。视网膜不可逆损伤是眼内炎患者视力丧失的核心原因,由病原体自身毒性和宿主继发性过度炎症反应共同介导^[1-3]。清除病原体是治疗的必要环节,但同时引发的宿主炎症反应也不容忽视。现有研究发现,单纯清除眼内致病菌无法阻断后续炎症损伤,即使眼内细菌载量下降,持续的炎症细胞浸润仍会不断破坏眼内组织结构^[4]。目前临床常采用玻璃体内注射地塞米松辅助抗生素治疗细菌性眼内炎,但该联合方案的疗效存在争议,且眼内使用糖皮质激素存在眼压升高、并发白内障等眼部不良反应,临床应用存在一定局限^[5-10]。近年来,神经-免疫调控通路成为眼部炎症性疾病的研究新方向,自主神经系统可参与机体炎症反应调控,适度的炎症反应有利于机体抵抗病原体入侵、清除坏死组织、促进损伤修复,而交感神经过度激活会放大炎症级联反应,加重眼部组织损伤,该致病机制已在细菌性角膜炎中得到验证^[11]。但交感神经是否参与细菌性眼内炎的病理进展仍未见明确报道。

视网膜组织表达多种肾上腺素能受体,可介导交感神经信号,发挥抗炎、保护视网膜神经细胞、抑制胶质细胞应激活等多重作用^[12]。胍乙啶为特异性交感神经抑制剂,可阻断交感神经末梢去甲肾上腺素释放,抑制交感神经异常激活。基于此,本研究拟通过建立兔细菌性眼内炎模型,全程不使用抗生素以排除抗菌干预干扰,探究交感神经抑制剂胍乙啶对细菌性眼内炎炎症反应的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及菌株 2.5 kg 左右雄性新西兰白兔 54 只,购自济南西岭角生物科技有限公司。将兔置于光/暗循环 12 h 环境中,自由获取食物和水。动物

实验严格遵守视觉和眼科研究协会的《关于在视觉和眼科研究中使用动物的声明》,并经山东第一医科大学附属青岛眼科医院伦理委员会批准(批文号:SDSYKYJS-20210419)。本研究中所使用的菌株为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA; ATCC43300),购自北京北纳创联生物技术研究院。

1.1.2 主要试剂及仪器 0.9%氯化钠注射液(青岛华仁生物技术有限公司);地塞米松磷酸钠注射液(5 mg:1 ml,济宁辰欣药业股份有限公司);胍乙啶(美国 MCE 公司);盐酸丙美卡因滴眼液(比利时爱尔康公司);复方托吡卡胺滴眼液(日本参天制药株式会社);聚维酮碘(浓度 5 000 mg/L)、75%医用酒精(济南利尔康医疗科技股份有限公司);AFF 固定液、LB 肉汤培养基、琼脂粉(北京索莱宝科技有限公司)。手术显微镜(德国 Zeiss 公司);裂隙灯显微镜(日本 Topcon 公司);全封闭自动脱水机(德国 Leica 公司);全自动染色机、分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细菌悬液的制备 从-80℃冰箱中取出细菌冻存管,立即经 38~40℃水浴快速复苏并适当摇动,直到内部冰晶全部溶解。在生物安全柜中开启冻存管,将内容物接种至 LB 琼脂培养基,37℃培养过夜后传代至 LB 肉汤培养基中,放入 37℃振荡培养箱中过夜生长至对数期。用无菌生理盐水重悬菌液,离心半径 10 cm,6 000 r/min,离心 5 min,洗涤细菌培养液 2 次后逐步稀释至实验所需的菌液浓度。

1.2.2 胍乙啶玻璃体内注射安全性测试和细菌性眼内炎模型建立及浓度筛选 取新西兰白兔 18 只,肌肉注射 0.5 ml 盐酸赛拉嗪注射液,经耳缘静脉注射 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)诱导全身麻醉。开睑器撑开眼睑,盐酸丙美卡因滴眼液点眼行表面麻醉,复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳,聚维酮碘溶液涂于眼表擦洗眼周组织,生理盐水冲洗以减少交叉感染。为避免眼压过高,行玻璃体内注射前先用固定镊夹持穿刺点对侧

或同侧角膜缘外球结膜及筋膜固定眼球。胰岛素注射器斜面朝下,在颞上方角膜缘内 1 mm 刺入前房。放松固定镊,将针头斜面转向角膜,缓慢抽取 50 μ l 房水,轻轻拔出针头。用胰岛素注射器从角膜缘后 2 mm 扁平部,朝向眼球中心垂直进针一定深度后避开晶状体,将 125、250、375、500 μ g 胍乙啶或 1.5×10^4 、 1.5×10^5 菌落形成单位(colony-forming unit, CFU) MRSA 新鲜菌液 50 μ l 缓慢注入玻璃体内,停留一段时间后棉签按压下缓慢拔出,每组 3 只白兔。不同浓度胍乙啶玻璃体内注射后第 3 天采用苏木精-伊红染色观察角膜和视网膜组织结构。不同浓度 MRSA 玻璃体内注射后第 1、3、5 天采用裂隙灯显微镜观察炎症反应情况。

1.2.3 实验动物分组及处理 取新西兰白兔 36 只,采用随机数表法将其分为对照组、地塞米松组、胍乙啶组和预防用药组,每组 9 只,其中对照组、地塞米松组、胍乙啶组单眼建模 1 d 后玻璃体内分别注射无菌生理盐水、4 mg/ml 地塞米松磷酸钠注射液、5 mg/ml 胍乙啶 50 μ l,预防用药组建模前 1 h 玻璃体内注射 5 mg/ml 胍乙啶 50 μ l,后续用药同胍乙啶组,从成功建模后第 1 天开始隔天分组进行药物治疗。

1.2.4 裂隙灯显微镜观察各组炎症反应 各组分别取 3 只白兔,建模后第 1、3、5、7、9、11 天,由 3 位眼科医师参照 Peyman 等^[13]建立的评分标准,分别对结膜、角膜、虹膜、玻璃体 4 种眼部组织的炎症程度进行独立评分(表 1),各单项评分为 0~3 分,炎症严重程度与评分分值呈正相关。取 3 位医师评分平均值作为最终统计数据。

1.2.5 玻璃体样本细菌培养测定各组眼内细菌载量 各组分别取 3 只白兔,采用标准梯度稀释法和细菌平板计数法测定各组眼内细菌载量。将 23G 针头连接在 1 ml 注射器上,表面麻醉、扩瞳、聚维酮碘溶液消毒后,在扁平部抽取 50 μ l 玻璃体样本,置于冰上的 2 ml 无菌 EP 管中,用 450 μ l 无菌生理盐水连续稀释 10 倍。取各梯度稀释液 10 μ l,重复 3 次滴于 LB 琼脂平

板上,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,计算各组建模后第 1、3、5 天兔眼 CFU 数量。

1.2.6 苏木精-伊红染色法观察各组眼组织结构 各组分别取 3 只白兔,建模后第 5 天,行全身麻醉后使用注射器抽取 30 ml 空气快速注入一侧耳缘静脉中处死白兔,尽快摘除眼球并用 AFF 固定液常温固定 48~72 h,期间间断轻轻摇动标本,以促进固定液对眼球的均匀渗透。按从后向前的顺序,沿视神经、玻璃体腔、晶状体和角膜的解剖路径,从视神经 1/3 处进刀,切入眼球约 1 cm 深,将刀片向左侧平移,切勿抽出,避免因玻璃体大量流失而导致眼球塌陷变软。另取一刀片,沿相同方向,于距第一切口约 4 mm 处平行进刀,切入深度约 1 cm。交替使用 2 把刀片,平行向前逐层剖切,取出晶状体,操作时需用力均匀,避免拉锯式切割。标本经梯度脱水后包埋于石蜡中,沿瞳孔-视神经轴位,从眼球后部切取 4 μ m 薄切片。切片经脱蜡至水后进行苏木精-伊红染色,显微镜下观察各组织结构。

1.2.7 胍乙啶体外抑菌实验 在生物安全柜中,每支 EP 管分别加入 1.4 ml LB 肉汤培养基和 50 μ l 胍乙啶(5 mg/ml)或头孢呋辛(15 mg/ml)或无菌生理盐水,以及 50 μ l 含 1.5×10^4 CFU MRSA 的细菌悬液,模拟眼内环境。置于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养箱中,每 2 h 取一管,使用分光光度计测定 600 nm 处吸光度值,监测细菌生长,连续测定 18 h,记录细菌生长的 3 个时期:延迟期、对数期和稳定期。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组不同时间点炎症评分和眼内细菌载量总体比较采用两因素方差分析,两两比较采用 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胍乙啶玻璃体内注射安全性

兔眼玻璃体内注射不同浓度胍乙啶后第 3 天,各组角膜结构完整,基质层未见水肿及炎症细胞浸润,胶原纤维排列规则。125、250 μ g 注射组视网膜组织结构正常,各层细胞排列紧密,大小均一,层次分明;375、500 μ g 注射组视网膜组织结构遭受破坏,各层细胞排列紊乱,部分坏死、脱落(图 1)。

表 1 实验性细菌性眼内炎的评分标准
Table 1 Scoring criteria for experimental bacterial endophthalmitis

得分	结膜	角膜	虹膜	玻璃体
0	正常	清晰	正常	清晰
1	轻度水肿	局灶性水肿	轻度充血	局部玻璃体混浊、部分眼底细节可见、红光反射良好
2	水肿、轻度充血、轻度渗出	弥漫性水肿	明显充血	中度玻璃体混浊、眼底细节不清、部分红光反射
3	水肿、轻度充血、大量渗出	混浊	明显充血、粘连、瞳孔不规则	无红光反射



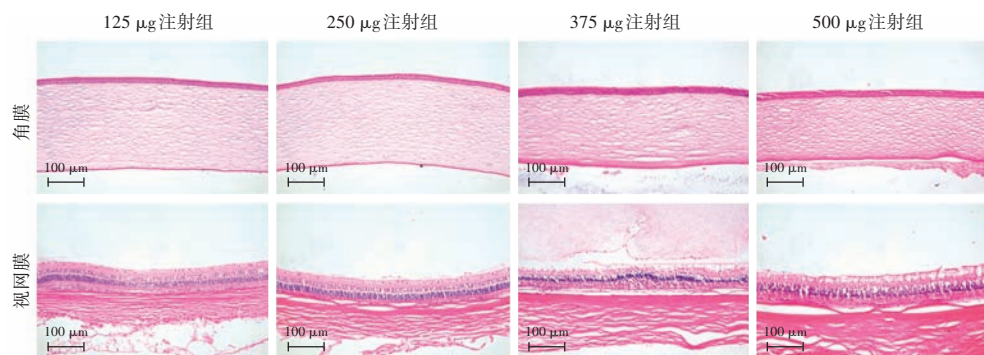


图1 玻璃体内注射不同浓度胍乙啶后兔角膜和视网膜苏木精-伊红染色图($\times 10$, 标尺=100 μm) 各组角膜结构完整,胶原纤维排列规则。125和250 μg 注射组视网膜组织结构正常,375和500 μg 注射组视网膜组织结构遭受破坏,各层细胞排列紊乱,部分坏死脱落

Figure 1 Hematoxylin and eosin staining of the rabbit corneas and retinas following intravitreal injection of different concentrations of guanethidine ($\times 10$, scale bar = 100 μm) In all groups, the corneal structure was intact, and collagen fibers were regularly arranged. The retinal tissue structure was normal in the 125 μg and 250 μg injection groups, whereas in the 375 μg and 500 μg injection groups, the retinal tissue structure was disrupted, with disorganized cellular arrangement across all layers and partial necrosis and sloughing

2.2 兔 MRSA 眼内炎模型菌液浓度筛选

1.5×10^4 CFU MRSA 注射组建模后第1天可见结膜充血、瞳孔区炎性渗出,至第5天出现前房炎性絮状渗出。 1.5×10^5 CFU MRSA 注射组第1天即出现结膜充血水肿、虹膜明显充血、粘连、瞳孔区大量炎性渗出、眼底红光反射减弱(图2)。 1.5×10^5 CFU 诱导的炎症反应过重,短期内大量渗出将影响多时间点炎症评估与样本采集,视网膜损伤进展过快,不利于观察药物对炎症全程的干预效果。 1.5×10^4 CFU 诱导的炎症反应

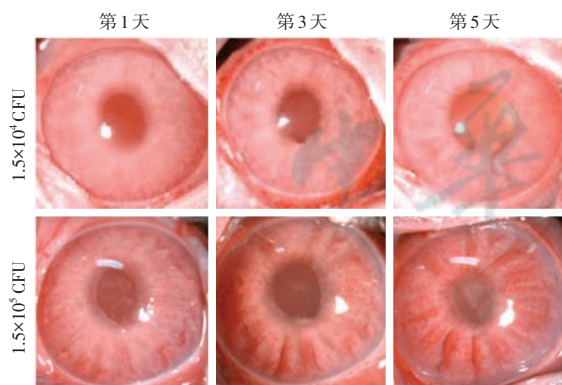


图2 不同浓度 MRSA 兔眼内炎模型建立 1.5×10^4 CFU 注射组炎症逐渐进展,第5天可见前房炎性絮状渗出物形成。 1.5×10^5 CFU 注射组第1天可见虹膜明显充血、粘连,瞳孔区大量炎性渗出 MRSA:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;CFU:菌落形成单位

Figure 2 Establishment of rabbit endophthalmitis model with different concentrations of MRSA In the 1.5×10^4 CFU injection group, inflammation progressed gradually, and inflammatory flocculent exudate was observed in the anterior chamber on day 5. In the 1.5×10^5 CFU injection group, obvious iris hyperemia, synechiae, and copious inflammatory exudate in the pupillary area were observed on day 1 MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; CFU: colony-forming units

适中、病程平稳,适用于多时间点动态评价各组炎症反应,故选用该浓度建立兔 MRSA 眼内炎模型进行后续实验。

2.3 各组建模后不同时间点炎症评分比较

对照组眼内炎症持续进展,结膜血管变粗增多,角膜血管翳形成,角膜水肿范围逐渐扩大、混浊,虹膜粘连、血管充血膨隆,房水闪烁严重,前房炎性渗出,眼底红光反射逐渐消失,最后形成黄色混浊。地塞米松组眼前节炎症较轻,可见

少量结膜新生血管形成、充血,角膜轻度水肿,前房少量炎性渗出,后段炎症逐渐进展,红光反射逐渐消失。胍乙啶组角膜水肿减轻,虹膜血管持续充血膨隆。预防用药组炎症最轻,少量结膜充血,角膜清澈透明,玻璃体清澈,红光反射良好(图3)。各组建模后不同时间点炎症评分总体比较差异有统计学意义($F_{\text{组别}} = 20.72, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 9.66, P < 0.001$),其中预防用药组第3、9、11天炎症评分小于相应时间点对照组、地塞米松组和胍乙啶组,预防用药组第7天炎症评分小于相应时间点对照组,地塞米松组和胍乙啶组第9天炎症评分均小于相应时间点对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与组内第1天相比,对照组第7、9、11天炎症评分显著上升,地塞米松组第3、11天炎症评分显著升高,胍乙啶组仅第11天炎症评分升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表2)。

2.4 各组建模后不同时间点菌落形成情况比较

建模后第1、3、5天,对照组、地塞米松组、胍乙啶组均出现大量金黄色菌落,预防用药组始终无菌落生长(图4)。各组建模后不同时间点 CFU 总体比较差异有统计学意义($F_{\text{组别}} = 15.73, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 9.45, P < 0.001$),其中预防用药组第3、5天 CFU 明显小于相应时间点地塞米松组,地塞米松组第5天 CFU 大于相应时间点对照组和胍乙啶组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);地塞米松组建模后 CFU 持续上升,第1、3、5天 CFU 两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表3)。

2.5 各组兔角膜和视网膜组织结构比较

建模后第5天,对照组和地塞米松组角膜基质层、

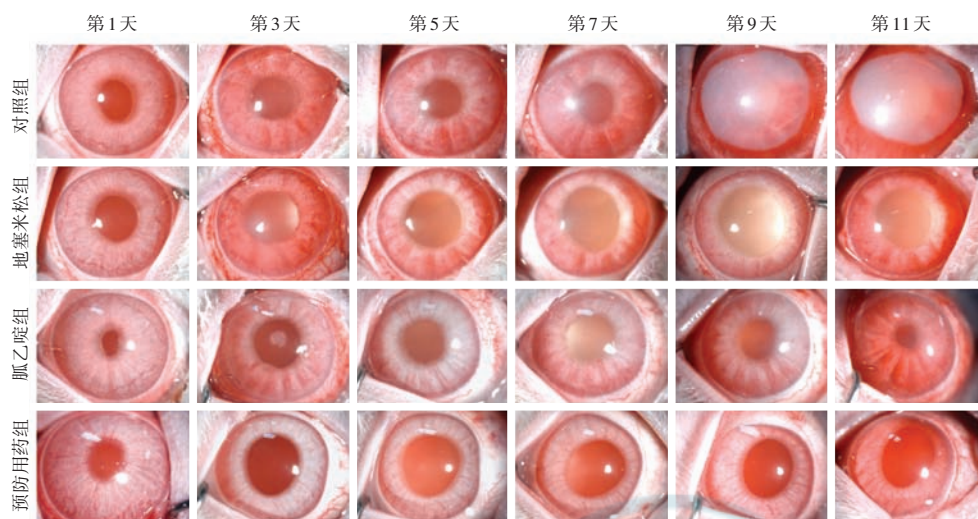


图3 各组建模后不同时间点裂隙灯显微镜图像 对照组炎症持续进展,角膜混浊,角膜血管翳形成,眼底红光反射消失形成黄色混浊。地塞米松组眼前节炎症较轻,后段炎症逐渐进展,红光反射消失。胍乙啶组虹膜血管持续充血膨隆。预防用药组炎症最轻,角膜清澈透明,红光反射良好

Figure 3 Slit-lamp microscopy images of different groups at different time points after modeling In the control group, inflammation continued to progress, resulting in corneal opacity, the formation of corneal neovascularization, and the disappearance of the red reflex in the fundus, leading to yellow opacity. In the dexamethasone group, anterior segment inflammation was mild, while posterior segment inflammation gradually progressed, and the red reflex disappeared. In the guanethidine group, the iris vessels persistently congested and swelled. The prophylactic treatment group exhibited the mildest inflammation, with a clear and transparent cornea and a good red reflex

表2 各组建模后不同时间点炎症评分比较($\bar{x} \pm s$, 分)
Table 2 Comparison of inflammation scores among various groups at different time points after modeling ($\bar{x} \pm s$, points)

组别	样本量	第1天	第3天	第5天	第7天	第9天	第11天
对照组	3	3.00±0.00	7.00±2.00	6.67±1.53	7.33±1.15 ^d	10.67±1.53 ^d	10.67±1.53 ^d
地塞米松组	3	3.00±0.00	8.00±2.00 ^d	6.67±1.53	6.33±1.53	6.67±2.89 ^a	8.67±2.52 ^d
胍乙啶组	3	3.00±1.00	6.00±1.00	4.67±0.58	6.33±1.53	6.67±2.08 ^a	8.00±1.00 ^d
预防用药组	3	4.33±1.53	2.00±1.00 ^{abc}	3.33±1.53	3.33±1.53 ^a	3.00±2.65 ^{abc}	4.00±2.65 ^{abc}

注: $F_{\text{组别}} = 20.72, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 9.66, P < 0.001$; $F_{\text{交互作用}} = 2.38, P = 0.01$ 。与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与地塞米松组比较, ^b $P < 0.05$; 与胍乙啶组比较, ^c $P < 0.05$; 与第1天比较, ^d $P < 0.05$ (两因素方差分析, Tukey 检验)
Note: $F_{\text{group}} = 20.72, P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 9.66, P < 0.001$; $F_{\text{interaction}} = 2.38, P = 0.01$. Compared with the control group, ^a $P < 0.05$; compared with the dexamethasone group, ^b $P < 0.05$; compared with the guanethidine group, ^c $P < 0.05$; compared with day 1, ^d $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, Tukey test)

玻璃体、视网膜组织中均可见大量炎性渗出及炎症细胞浸润,视网膜结构破坏严重,各层细胞排列紊乱,部分坏死脱落。胍乙啶组炎症细胞浸润及渗出减少,视网膜各分层依稀可见。预防用药组视网膜结构完整,各层细胞形态正常,排列紧密,层次分明,未见明显渗出和炎症细胞浸润(图5)。

2.6 各组 MRSA 体外生长情况比较

对照组 MRSA 培养的前 6 h 处于延迟期,菌体数量不增加,生长速度几乎为零;6 h 后进入对数生长期,该时期菌体数量按几何级数增加,增长速度较快;

16 h 后进入稳定期,死亡率与生长率相等,活细胞数量达到最高水平。胍乙啶组细菌生长情况和头孢呋辛组相似,细菌悬液吸光度值始终处于较低水平,位于 0 附近(图6)。

3 讨论

细菌感染性眼内炎患者的视力预后主要取决于致病菌的毒力、首诊视力和治疗效果。金黄色葡萄球菌是术后眼内炎的主要致病菌,占有病例的 6%~16%,其常导致严重视力损伤,约 50% 的患者最终视力低于 20/100^[14]。抗生素不规范使用和耐药菌株的增加使得眼部感染的治疗更为棘手。临床数据显示,MRSA 眼内炎已占金黄色葡萄球菌眼内炎病例的 40%^[15]。万古霉素是治疗 MRSA 眼部感染的一线抗生素,但临床已检出对万古霉素等糖肽类抗生素耐药的 MRSA 眼部感染菌株^[16]。寻找安全有效的非抗生素辅助干预方案具有重要临床价值。本实验选取新西兰白兔构建眼内炎模型,该动物眼球解剖结构与与人眼相似度高,可满足眼

内给药操作要求,且能通过裂隙灯显微镜更直观地观察到眼前节及后段的炎症反应情况,整体模型构建方法成熟可行。本研究预实验结果显示,低载量 MRSA 菌液可被玻璃体固有免疫自发清除,炎症自行消退,与既往研究结论一致^[17],同时也证实细菌性眼内炎建模存在明确细菌载量阈值:过低细菌载量无法突破宿主自身免疫防御系统,难以构建稳定持续的感染模型。因此本研究最终选用 50 μl 含 1.5×10^4 CFU MRSA 菌液玻璃体内注射进行建模,可获得病程稳定、炎症持续存在的细菌性眼内炎动物模型,能够满足后续药物对

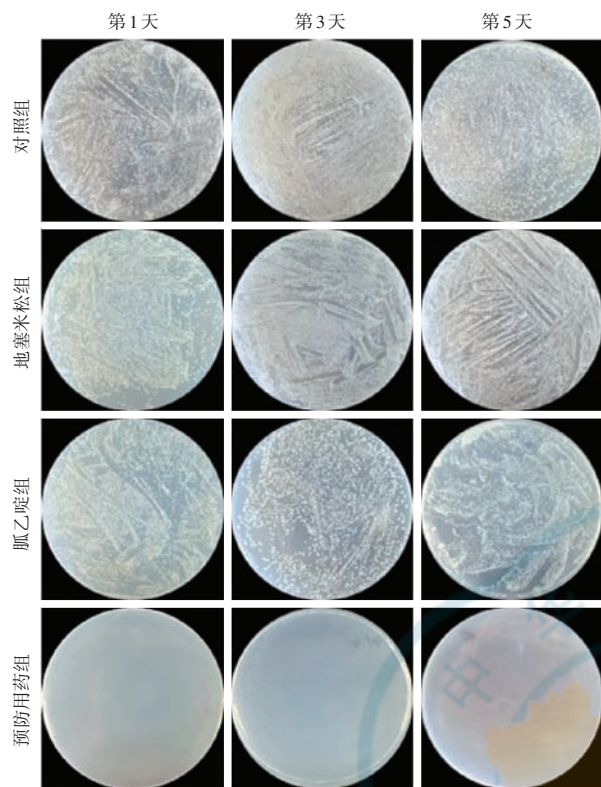


图 4 各组建模后不同时间点菌落形成情况 对照组、地塞米松组和胍乙啶组均出现大量金黄色菌落,预防用药组始终无菌落生长

Figure 4 Colony formation at various time points after *in vitro* culture The control group, dexamethasone group, and guanethidine group all exhibited a large number of golden-yellow colonies, while the prophylactic treatment group showed no colony growth at all time points

表 3 各组建模后不同时间点 CFU 比较 ($\bar{x} \pm s$, $\times 10^3$ CFU)
Table 3 Comparison of CFU among various groups at different time points after culturing ($\bar{x} \pm s$, $\times 10^3$ CFU)

组别	样本量	第 1 天	第 3 天	第 5 天
对照组	3	39.33 $\pm$ 6.03	900.00 $\pm$ 360.56	2 666.67 $\pm$ 2 023.20
地塞米松组	3	54.00 $\pm$ 26.00	15 800.00 $\pm$ 6 302.38 ^c	43 333.33 $\pm$ 23 094.01 ^{acd}
胍乙啶组	3	34.67 $\pm$ 5.51	7 533.33 $\pm$ 923.76	3 433.33 $\pm$ 750.56 ^b
预防用药组	3	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00 ^b	0.00 $\pm$ 0.00 ^b

注: $F_{\text{组别}} = 15.73, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 9.45, P < 0.001$; $F_{\text{交互作用}} = 7.13, P < 0.001$. 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与地塞米松组比较, ^b $P < 0.05$; 与第 1 天比较, ^c $P < 0.05$; 与第 3 天比较, ^d $P < 0.05$ (两因素方差分析, Tukey 检验) CFU: 菌落形成单位

Note: $F_{\text{group}} = 15.73, P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 9.45, P < 0.001$; $F_{\text{interaction}} = 7.13, P < 0.001$. Compared with the control group, ^a $P < 0.05$; compared with the dexamethasone group, ^b $P < 0.05$; compared with day 1, ^c $P < 0.05$; compared with day 3, ^d $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, Tukey test) CFU: colony-forming units

照干预实验的需求。

本研究所有分组均不使用抗生素,排除抗生素杀菌作用对胍乙啶抗炎作用的干扰,能够单独观察交感神经抑制对眼内炎症的调控作用;同时设置临床一线抗炎药物地塞米松作为阳性对照,可直观对比交感神

经抑制剂与传统糖皮质激素的抗炎疗效差异。实验分别设置建模前 1 h 胍乙啶预防用药组与建模后胍乙啶治疗组,分别模拟内眼手术术前高危感染预防、眼内炎发病后临床补救治疗 2 种真实临床场景,贴合临床诊疗需求。研究中预防用药组出现的轻微眼内炎症,判定为玻璃体内有创注射操作引发的无菌性炎症,由于所有分组均接受同等有创操作,该机械源性炎症干扰在各组间均衡分布,不会影响组间药物疗效的横向对比结果。

中性粒细胞作为眼内炎早期核心炎症细胞,其眼内浸润程度与视网膜结构损伤程度呈显著正相关^[3,18],抑制早期炎症细胞浸润是减轻眼内炎继发性视网膜损伤的关键靶点,抗炎干预在眼内炎全程治疗中具备不可替代的作用。本研究明确了胍乙啶不同给药时机存在显著疗效差异,也填补了其针对已发病眼内炎的临床应用价值。术前预防性使用胍乙啶可显著减轻 MRSA 诱导的眼内炎症反应,减少眼内炎症细胞浸润,保护视网膜组织结构完整,同时体外实验均验证胍乙啶预防给药具备类似抗生素的抑菌效果;但针对临床中已经确诊发病的眼内炎患者,胍乙啶组视网膜组织结构损伤依旧存在,说明发病后单独使用胍乙啶无法有效控制眼内炎症、逆转视网膜损伤,其不适合用于已发病眼内炎的临床补救治疗。出现上述疗效差异的核心原因在于交感神经抑制剂存在严格的用药窗口

期:在眼内炎症级联反应启动前预防性阻断交感神经过度激活,可提前抑制炎症通路活化、优化眼内免疫微环境,发挥抗炎联合辅助抑菌的双重作用;而眼内炎发生后,机体炎症级联反应已全面激活,视网膜损伤可能进入不可逆阶段,仅单一抑制交感神经活性,难以阻断已经启动的炎症损伤进程。与之相比,临床常用的地塞米松可直接广谱抑制多条炎症通路,术后干预依旧具备明确抗炎效果,二者作用通路于干预窗口期存在本质区别。既往相关研究大多仅分析交感神经对眼部炎症的整体调控作用,并未区分预防与治疗给药的疗效差异,本研究明确界定了胍乙啶在感染性眼内炎中的适用场景与临床边界,一定程度上弥补了现有研究的不足。此外,本研究还发现胍乙啶具备潜在抑菌活性,结合其化学结构分析,该作用可能与其分子中的胍基基团相关,和同为胍基化合物的临床常用消毒药物氯己定抑菌机制相

一定程度上弥补了现有研究的不足。此外,本研究还发现胍乙啶具备潜在抑菌活性,结合其化学结构分析,该作用可能与其分子中的胍基基团相关,和同为胍基化合物的临床常用消毒药物氯己定抑菌机制相

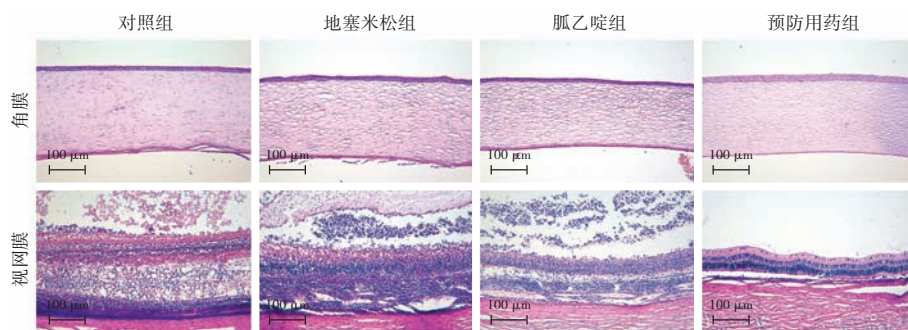


图 5 各组兔角膜及视网膜苏木精-伊红染色图 ($\times 10$, 标尺 = 100 μm) 对照组和地塞米松组可见大量炎性渗出及炎症细胞浸润, 视网膜结构破坏严重。胍乙啶组炎症细胞浸润及渗出减少, 视网膜各分层依稀可见。预防用药组视网膜结构完整, 未见明显渗出和炎症细胞浸润

Figure 5 Hematoxylin and eosin staining of rabbit corneas and retinas in different groups ($\times 10$, scale bar = 100 μm) In the control and dexamethasone groups, inflammatory exudates and inflammatory cell infiltration were observed, with severe disruption of retinal structure. In the guanethidine group, inflammatory cell infiltration and exudates were reduced, and the various layers of the retina were faintly visible. In the prophylactic treatment group, the retinal structure was intact, with no obvious exudate or inflammatory cell infiltration

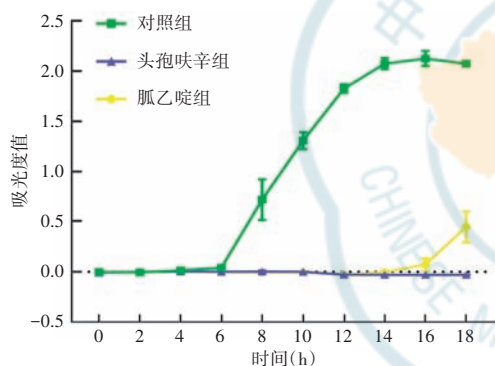


图 6 各组 MRSA 生长曲线 ($n=3$) 对照组 MRSA 于 6 h 开始进入对数生长期, 16 h 达高峰。胍乙啶组细菌生长情况和头孢唑辛组相似, 细菌悬液吸光度值始终处于较低水平, 位于 0 附近 MRSA: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

Figure 6 MRSA growth curves for each group ($n=3$) In the control group, MRSA entered the logarithmic growth phase at 6 hours and reached its peak at 16 hours. Bacterial growth in the guanethidine group was similar to that in the cefuroxime group, with the absorbance values of the bacterial suspensions remaining at a low level, near 0 MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

近^[19-20], 该发现也为当前耐药菌眼部感染的防控提供了全新的研究思路。

本研究仍存在一定的局限性: 首先动物模型存在固有缺陷, 实验仅选用新西兰白兔单一实验动物, 同时缺乏兔源特异性免疫检测抗体与基因编辑兔品系, 难以深入挖掘胍乙啶发挥作用的分子调控机制; 且研究仅针对 MRSA 一种耐药致病菌开展实验, 相关结论无法直接推广至其他致病菌诱发的眼内炎。其次药物相关研究不够完善, 本研究直接采用玻璃体内注射给药, 但未开展对应的眼内药代动力学检测, 胍乙啶在兔玻璃体、视网膜中的代谢周期尚不明确; 同时未探究胍乙

啶作用于肾上腺素能受体下游的具体炎症信号通路, 其抗炎以及抑菌作用的深层分子机制仍未阐明。另外实验观测手段存在局限, MRSA 眼内炎病情进展迅猛, 眼内大量炎性渗出会干扰影像学成像, 本研究无法开展光学相干断层扫描和眼底照相精细化眼底检查, 仅依靠裂隙灯显微镜观察及组织病理切片评估炎症程度, 评价指标较为单一; 且实验观测周期较短, 仅关注疾病早期病理改变, 胍乙啶眼内给药后的长期眼部安全性、远期视网膜保护效果仍不明确。针对以上研究不

足, 后续将从以下方向进一步深入探究: (1) 补充胍乙啶玻璃体内注射的药代动力学研究, 明确药物在兔眼内各组织的代谢特征, 系统评估眼内局部给药的眼部安全性, 为后续临床转化提供剂量依据。(2) 聚焦视网膜肾上腺素能受体及下游炎症通路, 深入解析胍乙啶抑制交感神经激活的具体分子机制, 重点阐明预防用药有效、治疗用药无效的通路差异。(3) 延长动物实验观测周期, 评估胍乙啶眼内给药的长期组织毒性与远期视网膜保护效果, 并拓展至表皮葡萄球菌等多种致病菌眼内炎模型, 验证胍乙啶预防作用的普适性。此外, 后续还可设置胍乙啶联合抗生素干预组别, 探究神经免疫靶向药物联合传统抗菌药物的协同治疗效果, 进一步挖掘其临床应用价值。

总体而言, 本研究成功构建了稳定可靠的兔 MRSA 眼内炎模型, 证实胍乙啶对眼内炎的干预效果具有显著的时间依赖性, 预防性用药可同时发挥抗炎与辅助抑菌双重作用, 适用于内眼手术、眼内注射等高危操作术前, 用于预防术后感染性眼内炎的发生; 但对于已经发病的眼内炎, 术后使用胍乙啶无明显抗炎疗效, 无法用于临床补救治疗。本研究立足神经-免疫调控新方向, 为临床眼内炎“预防优先、分层干预”的诊疗理念提供了基础实验支撑, 后续仍需完善药代动力学与分子机制相关研究, 进一步推动该类交感神经抑制剂在眼科感染性疾病中的临床转化应用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 梁倩: 实施研究、采集数据、统计分析及解释数据、文章撰写及修改; 邵征、樊峥: 实施研究、采集数据、统计分析及解释数据; 王维娜: 采集数据; 黄钰森: 酝酿和设计实验、对文章的知识性内容作批判性审阅及定稿

参考文献

- [1] Rudraprasad D, K V, Nirmal J, et al. Complement cascade 8 - alpha and calpain-2 in extracellular vesicles of human vitreous as biomarkers of infectious endophthalmitis[J]. Transl Vis Sci Technol, 2024, 13(5) : 14. DOI: 10.1167/tvst.13.5.14.
- [2] Kumar A, Pandey RK, Miller LJ, et al. Muller glia in retinal innate immunity: a perspective on their roles in endophthalmitis[J]. Crit Rev Immunol, 2013, 33(2) : 119-135. DOI: 10.1615/critrevimmunol.2013006618.
- [3] Miller FC, Coburn PS, Huzzatul MM, et al. Targets of immunomodulation in bacterial endophthalmitis[J]. Prog Retin Eye Res, 2019, 73 : 100763. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2019.05.004.
- [4] Das S, Singh S, Kumar A. Bacterial burden declines but neutrophil infiltration and ocular tissue damage persist in experimental *Staphylococcus epidermidis* endophthalmitis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11 : 780648. DOI: 10.3389/fcimb.2021.780648.
- [5] Moisseiev E, Abbassi S, Park SS. Intravitreal dexamethasone in the management of acute endophthalmitis: a comparative retrospective study[J]. Eur J Ophthalmol, 2017, 27(1) : 67-73. DOI: 10.5301/ejo.5000866.
- [6] Ching Wen Ho D, Agarwal A, Lee CS, et al. A review of the role of intravitreal corticosteroids as an adjuvant to antibiotics in infectious endophthalmitis[J]. Ocul Immunol Inflamm, 2018, 26(3) : 461-468. DOI: 10.1080/09273948.2016.1245758.
- [7] Conrady CD, Feist RM, Vitale AT, et al. Long-term visual outcomes of endophthalmitis and the role of systemic steroids in addition to intravitreal dexamethasone[J]. BMC Ophthalmol, 2020, 20(1) : 181. DOI: 10.1186/s12886-020-01449-2.
- [8] Bui DK, Carvounis PE. Evidence for and against intravitreal corticosteroids in addition to intravitreal antibiotics for acute endophthalmitis[J]. Int Ophthalmol Clin, 2014, 54(2) : 215-224. DOI: 10.1097/HIO.000000000000020.
- [9] Goñi FJ, Stalmans I, Denis P, et al. Elevated intraocular pressure after intravitreal steroid injection in diabetic macular edema: monitoring and management[J]. Ophthalmol Ther, 2016, 5(1) : 47-61. DOI: 10.1007/s40123-016-0052-8.
- [10] Rodrigo MJ, Martinez-Rincon T, Subias M, et al. Influence of sex on chronic steroid-induced glaucoma: 24-weeks follow-up study in rats[J]. Exp Eye Res, 2024, 238 : 109736. DOI: 10.1016/j.exer.2023.109736.
- [11] Xue Y, He J, Xiao C, et al. The mouse autonomic nervous system modulates inflammation and epithelial renewal after corneal abrasion through the activation of distinct local macrophages[J]. Mucosal Immunol, 2018, 11(5) : 1496-1511. DOI: 10.1038/s41385-018-0031-6.
- [12] Li T, Yang S, She X, et al. Modulation of α -adrenoceptor signalling protects photoreceptors after retinal detachment by inhibiting oxidative stress and inflammation[J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(6) : 801-813. DOI: 10.1111/bph.14565.
- [13] Peyman GA, Paque JT, Meisels HI, et al. Postoperative endophthalmitis: a comparison of methods for treatment and prophylaxis with gentamicin[J]. Ophthalmic Surg, 1975, 6(1) : 45-55.
- [14] Wu PC, Kuo HK, Li M, et al. Nosocomial postoperative endophthalmitis: a 14-year review[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2006, 244(8) : 920-929. DOI: 10.1007/s00417-005-0170-9.
- [15] Major JC, Engelbert M, Flynn HW, et al. *Staphylococcus aureus* endophthalmitis: antibiotic susceptibilities, methicillin resistance, and clinical outcomes[J]. Am J Ophthalmol, 2010, 149(2) : 278-283. DOI: 10.1016/j.ajo.2009.08.023.
- [16] Torun MM, Bahar H, Demirci M, et al. Two heterogeneously vancomycin-intermediate clinical isolates of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Turkish university hospital: brief report of a surveillance study[J]. Int J Antimicrob Agents, 2005, 26(6) : 508-510. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.001.
- [17] Meredith TA, Trabelsi A, Miller MJ, et al. Spontaneous sterilization in experimental *Staphylococcus epidermidis* endophthalmitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1990, 31(1) : 181-186.
- [18] Karthikeyan RS, Priya JL, Leal SM, et al. Host response and bacterial virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pneumoniae* corneal ulcers[J/OL]. PLoS One, 2013, 8(6) : e64867. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23750216/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0064867.
- [19] Merani R, McPherson ZE, Luckie AP, et al. Aqueous chlorhexidine for intravitreal injection antiseptics: a case series and review of the literature[J]. Ophthalmology, 2016, 123(12) : 2588-2594. DOI: 10.1016/j.ophtha.2016.08.022.
- [20] Ali FS, Jenkins TL, Boparai RS, et al. Aqueous chlorhexidine compared with povidone-iodine as ocular antiseptics before intravitreal injection: a randomized clinical trial[J]. Ophthalmol Retina, 2021, 5(8) : 788-796. DOI: 10.1016/j.oret.2020.11.008.

(收稿日期:2025-11-29 修回日期:2026-06-22)

(本文编辑:施晓萌 骆世平)

读者·作者·编者

本刊对来稿中作者署名的著录要求

作者向本刊投稿时署名应符合以下条件:(1)参与课题的选题和实验设计,参与实验资料的收集、分析和论证。(2)参与论文的起草或能够对论文中的方法学或关键部分进行修改。(3)能对审稿专家和编辑提出的修改意见进行核修,能够答辩并承担责任。(4)对论文的诚信负责。仅参与筹得资金或收集资料者以及仅对科研小组进行一般管理者均不宜署名为作者。文中如有外籍作者,应附外籍作者亲笔签名的在本刊发表的同意函。集体署名的文章应于题名下列出署名单位,于文末列出论文整理者的姓名,并须明确该文的主要责任者。

作者署名的名次应按对论文贡献大小顺序排列于文题下方,每篇论文须列出通信作者1名。如无特殊约定,则视第一作者为通信作者。作者(包括通信作者)的署名及其排序应在投稿前由所有研究者共同讨论确定,在编排过程中不宜变更或增减,尤其是通信作者和前三名作者,若确需变动者须提供所有署名作者的签名同意函并出示单位证明。有英文文题的论著和综述应有全部作者姓名的汉语拼音,列于英文文题之下。

(本刊编辑部)

