

引文格式:张红敏,刘素素,李金,柳慧,谢艳亭,王丽娅.双氯芬酸钠对小鼠真菌性角膜炎抗真菌疗效的影响[J].
眼科新进展,2014,34(7):607-611. doi:10.13389/j.cnki.rao.2014.0167

【实验研究】

双氯芬酸钠对小鼠真菌性角膜炎抗真菌疗效的影响[△]

张红敏 刘素素 李金 柳慧 谢艳亭 王丽娅

作者简介:张红敏,女,1969年出生,河南人,博士,副研究员,研究方向为角膜与眼表疾病的基础研究。联系电话:18637107236; E-mail:zhm0906@163.com

About ZHANG Hong-Min: Female, born in 1969. Doctor degree, associate research fellow. Tel:18637107236; E-mail:zhm0906@163.com

收稿日期:2014-03-13
修回日期:2014-04-08
本文编辑:盛丽娜

△基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81170831、81270991);河南省基础与前沿计划项目(编号:102300410024、112300410036、1123-0040093、132102310087);河南省科技创新人才计划项目(编号:144100510019)

作者单位:450003 河南省郑州市,河南省立眼科医院&河南省眼科研究所,河南省人民医院眼科,郑州大学人民医院眼科

通讯作者:王丽娅, E-mail:wangliya_55@126.com

Received date: Mar 13, 2014
Accepted date: Apr 8, 2014

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No.: 81170831, 81270991); Henan Provincial Fundamental and Frontier Technological Projects (No.: 102300410024, 112300410036, 11230040093, 13210-2310087); Henan Provincial Projects Innovative Talents of Science and Technology (No.: 144100510019)

From the Henan Eye Institute & Henan Eye Hospital, Department of Ophthalmology, Henan Provincial People's Hospital, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Responsible author: WANG Li-Ya, E-mail:wangliya_55@126.com

were rare, and the cells in corneal stroma increased in diclofenac sodium treatment group. In diclofenac sodium treatment group, the cells in corneal stroma were 72.67% positive neutrophils according to differentiation count of stromal cells.

Conclusion It should be cautious to use diclofenac sodium in treating fungal keratitis, because the clinical scores, infiltration of corneal inflammatory cells (mainly neutrophils) are significantly increased during antifungal drugs therapy together with topical application of diclofenac sodium in treating fungal keratitis in mice.

[Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34(7): 607-611]

Influence of diclofenac sodium on therapeutic effects of antifungal drugs for fungal keratitis in mice

ZHANG Hong-Min, LIU Su-Su, LI Jin, LIU Hui, XIE Yan-Ting, WANG Li-Ya

【Key words】 fungal keratitis; diclofenac sodium; ketoconazole; neutrophil; mouse

【Abstract】 Objective To observe the therapeutic effects of antifungal drugs combined with diclofenac sodium on corneal fungal keratitis. Methods C57BL/6J mice were chosen as experimental animals and *Fusarium solani* fungal keratitis as a model. Experiment was divided into four groups: control group, fungal keratitis model group, ketoconazole treatment group (ketoconazole therapy alone) and diclofenac sodium treatment group (treated with ketoconazole and diclofenac sodium). Each group was examined with slit lamp microscope and *in vivo* confocal scanning microscope at 1 day, 2 days, 3 days, 4 days and 5 days after operation. The severity of corneal disease was evaluated by clinical score with slit lamp microscope. The hypha areas and number of inflammatory cells *in vivo* confocal microscopy images were quantitated. The corneal pathological examination of control group and diclofenac sodium treatment groups were conducted with HE staining at postoperative 5 days. Results Clinical scores of cornea at each time point in fungal keratitis model group, ketoconazole treatment group and diclofenac sodium treatment group were significantly higher than that in control group ($P < 0.01$). The clinical scores at postoperative 5 days in diclofenac sodium treatment group was significantly higher than that of model group ($P < 0.001$). The clinical scores at postoperative 3 days, 4 days and 5 days in diclofenac sodium treatment group were significantly higher than those in ketoconazole treatment groups. The corneal hypha disappeared at postoperative 3 days in model groups and ketoconazole treatment groups. The area of corneal hypha had no significant change in diclofenac sodium treatment group compared with model group and ketoconazole treatment group ($P > 0.05$). The number of corneal inflammatory cells in fungal keratitis model group, ketoconazole treatment group and diclofenac sodium treatment group at each time point were significantly more than that in control group ($P < 0.01$). No significant differences in the number of inflammatory cells were found between ketoconazole treatment group and model group ($P > 0.05$). The number of inflammatory cells in diclofenac sodium treatment group within 4 - 5 days were significantly more than those in model group and ketoconazole treatment group ($P < 0.01$). The Pearson correlation analysis of corneal inflammatory cells and clinical scores in diclofenac sodium treatment group showed that inflammatory cells infiltration and corneal disease severity was positively correlated ($r = 0.860, P = 0.000$). HE staining showed that the cells in corneal stroma in control group

【关键词】 真菌性角膜炎;双氯芬酸钠;酮康唑;中性粒细胞;鼠

【摘要】 目的 观察抗真菌药物联合双氯芬酸钠对真菌性角膜炎的治疗效果。方法 选取 C57BL/6J 小鼠为实验动物,以角膜镰孢菌性角膜炎为模型。实验分为 4 组:手术对照组(不进行菌丝接种)、模型组、酮康唑组(单纯酮康唑治疗)和双氯芬酸钠

组(酮康唑联合双氯芬酸钠治疗)。每组于造模后1 d、2 d、3 d、4 d和5 d分别进行裂隙灯观察和活体共焦显微镜检查。裂隙灯下进行角膜病变严重程度临床评分;对活体共焦显微镜图片进行菌丝定量和炎症细胞计数。手术对照组和双氯芬酸钠组于手术后5 d进行角膜HE染色病理学检查。**结果** 模型组、酮康唑组和双氯芬酸钠组与手术对照组相比,各时间点角膜临床评分均有显著性增加(均为 $P<0.01$);双氯芬酸钠组5 d与模型组相比,临床评分显著增加($P<0.01$);双氯芬酸钠与酮康唑组相比,3 d、4 d和5 d的角膜临床评分显著增加(均为 $P<0.01$)。模型组、酮康唑组和双氯芬酸钠组3 d后角膜内菌丝消失;双氯芬酸钠组与模型组和酮康唑组相比,角膜内菌丝面积无明显变化(均为 $P>0.05$)。模型组、酮康唑组和双氯芬酸钠组与手术对照组相比,各时间点角膜炎症细胞数均有显著增多(均为 $P<0.01$);酮康唑组与模型组比较,各时间点炎症细胞数无显著性差异(均为 $P>0.05$);双氯芬酸钠组与模型组和酮康唑组相比,炎症细胞数目4~5 d均有显著性增多(均为 $P<0.01$)。双氯芬酸钠组角膜内炎症细胞浸润与角膜临床评分的Pearson相关分析显示,二者呈明显正相关($r=0.860, P=0.000$)。造模后5 d,手术对照组和双氯芬酸钠组HE病理学检查结果显示:手术对照组角膜基质内细胞很少;双氯芬酸钠组基质增厚,基质内细胞增多,基质内细胞分类计数显示,可以确认的中性粒细胞占基质所有细胞总数的72.67%。**结论** 小鼠真菌性角膜炎进行抗真菌药物治疗的同时局部应用双氯芬酸钠,不但不能减轻角膜病变的严重程度,反而增加了真菌性角膜炎的临床评分,增加了角膜炎症细胞浸润,炎症细胞以中性粒细胞为主。提示进行真菌性角膜炎治疗时,慎用双氯芬酸钠。

[眼科新进展, 2014, 34(7): 607-611]

真菌性角膜炎是由真菌感染引起的一种严重的感染性角膜病,近年来其在我国发病率一直呈上升趋势,已成为角膜盲的首位病因^[1]。真菌性角膜炎的临床治疗非常棘手,主要原因是:(1)供临床应用的疗效确切的眼表用抗真菌药物很少,常用的那他霉素滴眼液不但价格昂贵,而且约有46.6%的镰孢菌患者对该药不敏感^[2],而镰孢菌属恰恰是在我国占真菌性角膜炎菌种首位的^[1],因此,该药的整体疗效并不令人满意;(2)即使经过药物治疗,真菌被杀灭了,也往往由于炎症细胞对组织的破坏最终仍造成角膜混浊,瘢痕形成。有研究显示,35.6%~72.3%的患者临床治愈后遗留下角膜白斑^[3,4],如果白斑在瞳孔部位会影响视力甚至致盲。另有研究表明,约59.5%的真菌性角膜炎遗留白斑的患者需要进行角膜移植^[5],而我国角膜供体又极其缺乏^[6]。鉴于以上现状,我们的设想是:在有效抗真菌药物治疗前提下,应用非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)双氯芬酸钠滴眼液,以期在药物治疗真菌的前提下,减轻炎症细胞浸润,减轻炎症细胞对组织的破坏,从而减轻角膜组织损伤,减轻基质混浊和瘢痕形成。本研究以腐皮镰孢菌性真菌性角膜炎为模型,对单纯抗真菌治疗以及局部加用双氯芬酸钠治疗效果进行观察,现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级雄性10~12周龄C57BL/6J小鼠24只,购自南京大学模式动物研究所。按每笼6只饲养于SPF级动物房。饲养温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,湿度为59%~61%,每日光照与黑暗时间各为12 h,由专人管理。动物的饲养与使用均遵照视觉与眼科研究协会制定的科研动物使用规范,经郑州大学实验动物伦理委员会和河南省眼科研究所生命科学实验管理与伦理审查委员会批准。

1.1.2 实验用真菌标准菌株 腐皮镰孢菌(编号:3.1791)购自北京中国科学院微生物研究所中国微

生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。按照标准方法进行复苏和传代,生长良好的真菌用于实验。

1.1.3 主要实验试剂及仪器 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 双氯芬酸钠滴眼液(河南省眼科研究所院内制剂,批号:20120203); $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酮康唑滴眼液(河南省眼科研究所院内制剂,批号:20120114);海德堡视网膜激光断层扫描系统3代(HRT3)(德国Heidelberg公司);SL-8Z型裂隙灯、OMS-90型体视解剖显微镜(日本Topcon公司);免疫荧光显微镜(80i)及AR分析软件(日本Nikon公司);无菌碳钢11号手术刀片(上海浦东金环医疗用品有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将24只小鼠按照体质量大小排序,查随机数字表将其随机分为手术对照组、模型组、酮康唑组和双氯芬酸钠组,每组各6只。手术对照组不接种真菌,其余均按照真菌性角膜炎模型的制作方法造模。

1.2.2 小鼠真菌性角膜炎模型的建立 小鼠腹腔内注射 $80\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 戊巴比妥钠全身麻醉,用 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸丁卡因眼液滴眼进行角膜表面麻醉,按照参考文献[2-3]的方法建立双眼真菌性角膜炎模型。方法简介如下:使用无菌手术刀片在角膜中央2 mm环钻区域内做十字划痕,深度至浅基质;取与腐皮镰孢菌共培养3~7 d的带有腐皮镰孢菌的竹签尖端在创面上来回涂抹腐皮镰孢菌。活体共焦显微镜下有菌丝生长者判定为角膜炎模型制作成功。

1.2.3 给药方式 酮康唑组:真菌接种后9 h进行模型判定,模型成功者开始应用酮康唑,1.5 h滴眼1次,共8次,间隔12 h后重复进行,直至实验结束。双氯芬酸钠组:酮康唑给药方式同酮康唑组,在酮康唑治疗基础上,于真菌接种后33 h给予双氯芬酸钠滴眼,每4 h滴眼1次,共3次,间隔12 h后重复进行,直至实验结束。为保证用药效果,每次滴眼后保持眼裂睁开约1 min,确保药物进入结膜囊。手术对照组和模型组均不给予任何药物。

1.2.4 角膜病变严重程度的裂隙灯观察 各组小鼠于造模成功后1 d、2 d、3 d、4 d、5 d在裂隙灯下观

察角膜,进行角膜病变临床评分并拍照,临床具体评分规则参照文献[7-8]。

1.2.5 角膜活体共聚焦显微镜检查 各组小鼠于造模成功后1 d、2 d、3 d、4 d、5 d进行活体共聚焦显微镜检查。小鼠麻醉后,调整操纵台高度和 CCD 摄像头位置,涂 Vidisic 眼凝胶(美国博士伦公司生产)。双手持小鼠,使小鼠固定在下颌托上,充分暴露眼球,使小鼠角膜中央区域与角膜接触帽平行,调整物镜位置直至激光光束位于小鼠角膜病变区域。激光波长为 670 nm,观察以病灶为中心 380 μm × 380 μm 视野范围,层间扫描深度为 5 μm。从角膜内皮层开始到上皮层结束,连续扫描能清晰显示角膜各层及真菌菌丝浸润的层次,采集图片并保存。

1.2.6 菌丝面积定量和炎症细胞计数方法 挑选从角膜内皮层到上皮层所有图像中有菌丝的图像,导入到 Nikon AR 软件中,手动勾画每条菌丝边缘,定量菌丝面积,每个角膜所有视野菌丝面积之和作为每角膜菌丝面积。手动计数炎症细胞个数,每个角膜所有视野炎症细胞之和作为每角膜炎症细胞数。最后以每角膜菌丝面积和炎症细胞数目进行统计分析。

1.2.7 角膜切片 HE 病理学检查 取下造模后 5 d 手术对照组和双氯芬酸钠组小鼠的角膜,常规包埋、切片、HE 染色。双氯芬酸钠组选取病灶部位切片,手术对照组选取划痕范围切片,每角膜各选 2 张切片,每张切片随机选取 5 个视野,于 40 × 物镜下进行细胞计数。每个细胞核按一个细胞计数,典型的分叶状细胞核记作中性粒细胞,计算典型的中性粒细胞和所有基质内细胞总数的比例。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计分析,以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述计量资料。相同时间点各组间两两比较采用单因素方差分析,方差齐,采用 LSD 检验;方差不齐,采用 Tamhane's T2 检验。对真菌性角膜炎病变角膜中炎症细胞数目与临床评分间的关系评价采用 Pearson 积矩相关分析,并对相关系数进行假设检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 双氯芬酸钠对角膜临床评分的影响 手术对
表 1 各组不同时间点角膜临床评分结果

Table 1 Corneal clinical scores of each group at different time points					
($\bar{x} \pm s$, Score)					
Group	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days
Control	0.5 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Model	3.0 ± 0.0 *	4.4 ± 0.7 *	7.8 ± 1.5 *	7.4 ± 1.1 *	6.6 ± 0.7 *
Ketoconazole	2.9 ± 0.4 *	4.4 ± 0.9 *	4.4 ± 1.1 **	4.3 ± 0.9 **	4.0 ± 0.8 **
Diclofenac sodium	2.8 ± 0.5 *	4.1 ± 0.8 *	8.4 ± 1.3 * [△]	9.5 ± 1.6 * [△]	11.0 ± 1.9 ** [△]

Note: Compared with control group, * $P < 0.01$; Compared with model group, # $P < 0.01$; Compared with ketoconazole group, [△] $P < 0.01$

2.2 双氯芬酸钠对真菌性角膜炎真菌菌丝的影响
各组小鼠不同时间点活体共焦显微镜典型图片见图 2。手术对照组:造模后 1 d 见炎症细胞浸润,2 d

对照组 1 d 时,角膜中央部位可见极轻微混浊,随时间延长角膜混浊程度减轻、范围缩小,1 d 后恢复正常(图 1A)。模型组以及各治疗组均出现真菌性角膜炎表现,接种 24 h 后角膜出现毛玻璃样水肿,随后病变进展迅速,大多出现典型的菌丝苔被,部分可见免疫环、卫星灶。模型组 72 h 时病变最为严重,72 h 后病变逐渐减轻(图 1B);酮康唑组用药后病变范围得到控制(图 1C);双氯芬酸钠组应用双氯芬酸钠后,病变范围逐渐扩散,混浊加深,病变加重,有的角膜出现前房积脓(图 1D)。各组不同时间点角膜临床评分结果见表 1。从表 1 可以看出,模型组、酮康唑组和双氯芬酸钠组与手术对照组相比,各时间点角膜临床评分均有显著增加($P < 0.01$),说明造模成功;酮康唑组 3 d、4 d 和 5 d 的角膜临床评分较模型组显著降低(均为 $P < 0.01$),说明酮康唑治疗有效;双氯芬酸钠组 5 d 角膜临床评分较模型组升高,差异有显著统计学意义($P < 0.01$),说明 5 d 时双氯芬酸钠治疗比不治疗病变还重。双氯芬酸钠组与酮康唑组相比,3 d、4 d 和 5 d 的角膜临床评分差异有显著统计学意义(均为 $P < 0.01$),说明加用双氯芬酸钠治疗,角膜炎反而加重。

Figure 1 Typical slit lamp pictures of each group. A: Control group; B: Model group; C: Ketoconazole group, decreased after 3 days; D: Diclofenac sodium group 各组典型裂隙灯照片。A:手术对照组;B:模型组;C:酮康唑组;D:双氯芬酸钠组

时减少,3 d 时基本恢复正常(图 2A)。模型组:造模后 1 ~ 2 d 基质内大量菌丝和炎症细胞浸润;3 d 时菌丝破碎,仅偶见,大量炎症细胞浸润;4 d 后菌丝消

失,炎症细胞逐渐减少、消失(图2B)。酮康唑组:造模后1 d 基质内大量菌丝和炎症细胞;2 d 时菌丝变细,有破碎,炎症细胞增多;3 d 时菌丝破碎,仅偶见,炎症细胞大量;4 d 后菌丝消失,炎症细胞逐渐减少、消失(图2C)。双氯芬酸钠组:造模后1~2 d 基质内大量菌丝和炎症细胞,3 d 时未找到典型菌丝,炎症细胞大量,并且随时间延长而增多(图2D)。各组不同时间点角膜内真菌菌丝面积见表2。从表2可以看出,造模后1 d,模型组、酮康唑组和双氯芬酸钠组间真菌菌丝面积相比差异无统计学意义($P>0.05$),造模后2~3 d,酮康唑组和双氯芬酸钠组菌丝面积较模型组均有减少趋势,但组间相比差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$),可能由于样本量较少、组间变异较大导致。模型组、酮康唑组和双氯芬酸钠组3 d 后角膜内菌丝消失,说明小鼠的真菌性角膜炎有自愈倾向。双氯芬酸钠组与模型组和酮康唑组相比差异无统计学意义,说明双氯芬酸钠对角膜内菌丝无影响。

Figure 2 Typical *in vivo* confocal images. A:Control group;B:Model group;C: Ketoconazole group;D: Diclofenac sodium group. Pink arrow indicated inflammatory cells, yellow arrow indicated fungal hyphae 各组典型活体共焦显微镜图片。A:手术对照组;B:模型组;C:酮康唑组;D:双氯芬酸钠组。粉红色箭头所指为炎症细胞;黄色箭头所指为真菌菌丝

表2 各组不同时间点角膜内真菌菌丝面积
Table 2 Corneal fungal hyphae area of each group at different time points ($\bar{x} \pm s, S/mm^2$ pre cornea)

Group	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days
Control	-	-	-	-	-
Model	490.8 ± 107.3	457.7 ± 161.2	27.9 ± 16.9	0	0
Ketoconazole	491.1 ± 87.3	369.0 ± 68.2	15.1 ± 5.9	0	0
Diclofenac sodium	506.6 ± 81.7	398.2 ± 94.4	14.9 ± 4.2	0	0

2.3 双氯芬酸钠对角膜炎症细胞浸润的影响 各组不同时间点角膜内炎症细胞浸润情况见表3。从表3可以看出,模型组、酮康唑组和双氯芬酸钠组与

手术对照组相比,各时间点角膜炎症细胞数均有显著增多(均为 $P<0.01$),说明真菌感染引起的炎症细胞浸润较无菌创伤严重;酮康唑组与模型组比较,各时间点炎症细胞数差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$),说明酮康唑治疗对炎症细胞浸润无明显影响;双氯芬酸钠组与模型组和酮康唑组相比,炎症细胞数目4~5 d 均显著性增多(均为 $P<0.01$),说明加用双氯芬酸钠治疗,角膜内炎症细胞浸润增多。

2.4 双氯芬酸钠组角膜临床评分和炎症细胞浸润的相关关系 对双氯芬酸钠组角膜内炎症细胞浸润与角膜临床评分进行 Pearson 相关分析,结果显示,炎症细胞浸润和角膜病变严重程度呈明显正相关($r=0.860, P=0.000$)。

表3 各组不同时间点角膜内炎症细胞浸润情况
Table 3 Corneal infiltrating cells numbers of each group at different time points

($\bar{x} \pm s$, numbers per cornea)					
Group	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days
Control	1064 ± 144	939 ± 327	375 ± 89	177 ± 37	65 ± 19
Model	1647 ± 221 *	2037 ± 163 *	2864 ± 233 *	1462 ± 156 *	582 ± 627 *
Ketoconazole	1447 ± 138 *	1952 ± 103 *	2725 ± 188 *	1443 ± 97 *	597 ± 57 *
Diclofenac sodium	1584 ± 83 *	1901 ± 99 *	2612 ± 72 *	3727 ± 195 *#△	4845 ± 254 *#△

Note: Compared with control group, * $P<0.01$; Compared with model group, # $P<0.01$; Compared with ketoconazole group, △ $P<0.01$

2.5 病理学检查结果 造模后5 d,手术对照组和双氯芬酸钠组 HE 病理学检查结果显示:手术对照组角膜基质内细胞很少,细胞核形状提示为基质细胞(图3A);而双氯芬酸钠组基质增厚,基质内细胞增多,多数为分叶状中性粒细胞核型(图3B)。基质内细胞分类计数显示,可以确认的中性粒细胞占基质所有细胞总数的72.67%,提示基质内细胞以中性粒细胞为主。

Figure 3 Typical corneal HE staining pictures of fungal infection after 5 days in diclofenac sodium group. A:Control group;B:Diclofenac group. Red arrow indicated typical keratocyte nucleus, yellow arrow indicated typical neutrophil nucleus 造模后5 d 角膜典型 HE 染色病理学图片。A:手术对照组;B:双氯芬酸钠组。红色箭头所指为典型的基质细胞细胞核。黄色箭头所指为典型的中性粒细胞细胞核

3 讨论

通过吞噬细胞吞噬并杀灭真菌等病原微生物,是生物体最为基本和重要的天然免疫机制。中性粒细胞是数量最多的一种白细胞,也是真菌性角膜炎

中最主要的免疫细胞,在角膜真菌感染中发挥着重要作用^[7-9]。一般情况下,中性粒细胞可快速募集至感染部位,吞噬病原微生物后形成吞噬泡,继而吞噬泡与溶酶体融合,通过氧化依赖性或非氧化依赖性途径杀灭病原菌,这种经典的中性粒细胞杀灭病原菌的方式被称为胞内杀灭病原微生物途径。然而,吞噬了大量病原菌的中性粒细胞自身最终往往死亡裂解,释放出大量毒性物质和多种生物活性介质,在杀灭病原菌的同时引起化脓性炎症反应和组织坏死^[10]。因此,对真菌感染角膜而言,中性粒细胞是一把双刃剑,一方面吞噬、杀灭真菌以控制感染进程,另一方面导致强烈的炎症反应和组织损伤。最终的结局是,虽然真菌被杀灭了,但由于严重的角膜组织破坏,角膜瘢痕形成,最终仍严重影响视力,甚至致盲。

在有效抗真菌治疗的前提下,减少中性粒细胞在角膜感染部位的浸润,从而减轻组织损伤是我们极力想解决的问题。临床上常用的双氯芬酸钠是非甾体类抗炎药的一种,在不引起免疫抑制的情况下,可以抑制 COX 活性,阻断花生四烯酸向前列腺素转化,同时也能促进花生四烯酸与甘油三酯结合,降低细胞内游离的花生四烯酸浓度,间接抑制白三烯的合成,从而发挥抗炎作用^[11]。前期有报道,真菌性角膜炎早期施行病灶清创加生物羊膜移植和双氯芬酸钠治疗,对真菌性角膜炎治愈后角膜瘢痕形成有效^[12]。我们研究的初衷是希望能在有效抗真菌药物治疗前提下,联合应用双氯芬酸钠滴眼液,以减轻炎症细胞浸润,减轻炎症细胞对组织的破坏,从而减轻角膜组织损伤,减轻基质混浊和瘢痕形成。

但是我们的研究结果与预期相反:酮康唑加用双氯芬酸钠治疗,不但不能减轻角膜病变的严重程度,反而增加了真菌性角膜炎的临床评分,增加了角膜炎炎症细胞浸润。此结果可能与双氯芬酸钠的副作用有关。国外有文献报道:正常或穿透性角膜移植术患者局部应用双氯芬酸钠滴眼液,可以导致角膜感觉下降及持续性角膜上皮缺陷^[13-14]。也有文献认为,双氯芬酸钠滴眼液引起角膜损伤以及溶解的原因与角膜内基质金属蛋白酶(metalloproteinases, MMP)有关,双氯芬酸钠能诱导角膜表达 MMP-1、MMP-2 和 MMP-8,引起角膜损伤和溶解^[15]。我们的研究发现,双氯芬酸钠滴眼液引起角膜内大量中性粒细胞浸润,目前未检索到类似文献。最终导致角

膜病变加重的原因是否与中性粒细胞释放的酶类有关,有待进一步研究。

本研究结果显示,真菌性角膜炎小鼠模型在抗真菌治疗前提下加用双氯芬酸钠治疗,不仅不能减轻病情,反而会加快角膜损伤,使病变加重。此结果可能与双氯芬酸钠副作用有关。本研究结果提示,在进行真菌性角膜炎治疗时,慎用双氯芬酸钠治疗。

参考文献

- 1 Wang L, Sun S, Jing Y, Han L, Zhang H, Yue J. Spectrum of fungal keratitis in central China[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2009, 37(8):763-771.
- 2 Pradhan L, Sharma S, Nalamada S, Sahu SK, Das S, Garg G. Natamycin in the treatment of keratomycosis: Correlation of treatment outcome and *in vitro* susceptibility of fungal isolates[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2011, 59(6):512-514.
- 3 Rautaraya B, Sharma S, Kar S, Das S, Sahu SK. Diagnosis and treatment outcome of mycotic keratitis at a tertiary eye care center in eastern India[J]. *BMC Ophthalmol*, 2011, 11(1):39.
- 4 Mohd-Tahir F, Norhayati A, Siti-Raihan I, Ibrahim M. A 5-year retrospective review of fungal keratitis at Hospital Universiti sains Malaysia[J]. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2012, 2012:851563.
- 5 Saha S, Banerjee D, Khetan A, Sengupta J. Epidemiological profile of fungal keratitis in urban population of West Bengal, India[J]. *Oman J Ophthalmol*, 2009, 2(3):114-118.
- 6 谢立信. 我国角膜手术的现状和发展策略[J]. *中华眼科杂志*, 2005, 41(8):702-704.
- 7 张红敏, 刘素素, 许中中, 马聪慧, 谢艳平, 吴细丕, 等. 小鼠真菌性角膜炎中主要免疫细胞的作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30(9):779-784.
- 8 Zhang H, Wang L, Li Z, Liu S, Xie Y, He S, et al. A novel murine model of *Fusarium solani* keratitis utilizing fluorescent labeled fungi[J]. *Exp Eye Res*, 2013, 110(1):107-112.
- 9 Mircescu MM, Lipuma L, van Rooijen N, Pamer EG, Hohl TM. Essential role for neutrophils but not alveolar macrophages at early time points following *Aspergillus fumigatus* infection[J]. *J Infect Dis*, 2009, 200(4):647-656.
- 10 Epstein FH, Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils[J]. *N Engl J Med*, 1989, 320(6):365-376.
- 11 Lindstrom R. The pharmacologic and pathophysiologic rationale for using NSAIDs in ocular inflammatory disease and ocular surgery[J]. *Int Ophthalmol Clin*, 2006, 46(4):7-11.
- 12 张鹏, 李丹, 章剑, 陈金鹏. 生物羊膜移植联合双氯芬酸钠治疗真菌性角膜溃疡[J]. *临床眼科杂志*, 2009, 17(5):464-465.
- 13 Szerenyi K, Sorken K, Garbus JJ, Lee M, McDonnell PJ. Decrease in normal human corneal sensitivity with topical diclofenac sodium[J]. *Am J Ophthalmol*, 1994, 118(3):312-315.
- 14 Shimazaki J, Saito H, Yang HY, Toda I, Fujishima H, Tsubota K. Persistent epithelial defect following penetrating keratoplasty: An adverse effect of diclofenac eyedrops[J]. *Cornea*, 1995, 14(6):623-627.
- 15 Reviglio VE, Rana TS, Li QJ, Ashraf MF, Daly MK, O'Brien TP. Effects of topical nonsteroidal antiinflammatory drugs on the expression of matrix metalloproteinases in the cornea[J]. *J Cataract Refract Surg*, 2003, 29(5):989-997.