

加替沙星对金黄色葡萄球菌角膜溃疡作用的实验研究

张晓辉 孙乃学 王峰 熊全臣 郭琳

Experimental research of gatifloxacin on staphylococcus aureus corneal ulcer

Zhang Xiaohui, Sun Naixue, Wang Feng, Xiong Quanchen, Guo Lin. Department of Ophthalmology, Affiliated Second Hospital of Xi'an Jiaotong University Medical College, Xi'an 710004, China

Abstract Objective Staphylococcus aureus can lead to severe corneal ulcer, and gatifloxacin was used to the treatment of infectious system diseases and keratitis. This study aimed to evaluate therapeutic effect of gatifloxacin on staphylococcus aureus rabbit corneal ulcer and its ocular irritation. **Methods** Corneal ulcer model was created in 30 eyes of 15 rabbits by injecting the 0.1 mL of staphylococcus aureus fluid (3×10^8 /mL) into corneal stroma to form the milky white bubble with the diameter of 4.0 - 6.0 mm. 0.3% gatifloxacin (experimental group), 0.3% ofloxacin (positive control group) and 0.9% saline solution was topically administered after 24 hours 6 times per day at 2-hour interval for 18 days in 10 eyes of 3 groups respectively. Corneal ulcer area was evaluated clinically under the slim lamp and scored based on the Trousdale criteria daily, and corneal inflammatory reaction was scored based on Draize criteria. The bacteria culture for Tenon's secretion was taken using plate streaking. Corneal specimen were collected for histopathological examination. **Results** No statistically significant difference was found in corneal ulcer area among three groups in the first day ($F = 0.80, P = 0.46$). Corneal ulcer area was significantly increased from 3 days through 18 days after injection of staphylococcus aureus fluid ($P < 0.01$). In 18 days after injection of staphylococcus aureus fluid, corneal ulcer cured, and granulation tissue, neovascularization and infiltration of lymphocytes were seen in gatifloxacin group; while the structure of whole layers of cornea was indistinct, and more granulation tissue, neovascularization and inflammatory cells were found in ofloxacin group. In saline solution group, corneal ulcer was still existed, and diffuse corneal inflammation, severe inflammation response were seen under the light microscope. Statistical comparisons of ocular irritation scores among those were insignificantly different ($P > 0.05$). **Conclusion** 0.3% gatifloxacin has a better therapeutic effect on staphylococcus aureus-induced corneal ulcer in rabbit than 0.3% ofloxacin. Both 0.3% gatifloxacin and 0.3% ofloxacin have less irritation to ocular tissue.

Key words gatifloxacin; staphylococcus aureus; corneal ulcer

摘要 目的 通过动物实验评价加替沙星治疗金黄色葡萄球菌角膜溃疡的疗效及刺激性。**方法** 建立金黄色葡萄球菌角膜溃疡的动物模型,以生理盐水为阴性对照,0.3%氧氟沙星为阳性对照,0.3%加替沙星连续滴眼7d,用药后6h开始每日裂隙灯显微镜下观察、记录角膜溃疡面积并评分,同时进行病理检查。**结果** 生理盐水组和0.3%加替沙星组之间,0.3%氧氟沙星组和0.3%加替沙星组之间角膜溃疡面积比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。0.3%加替沙星组与生理盐水组眼刺激分值比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 0.3%加替沙星对兔眼金黄色葡萄球菌性角膜溃疡有较好的疗效,优于0.3%氧氟沙星,且点眼无刺激性。

关键词 加替沙星; 金黄色葡萄球菌; 角膜溃疡

分类号 R 772.21 R 988.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)10-0854-04

目前,全身应用加替沙星已广泛用于临床,治疗各

种敏感菌引起的系统性感染性疾病,而在眼科的应用尚未见报道。国外报道加替沙星常用于治疗屈光手术后或其他原因引起的分枝杆菌性角膜炎以及其他敏感菌引起的角膜感染^[1]。本实验通过建立金黄色葡萄

本课题为陕西省科学技术研究发展计划项目资助[2004k10-C7(2)]
 作者单位:710004 西安交通大学第二医院眼科
 通讯作者:张晓辉 (Email: tonyzxh0324@163.com)

球菌的兔角膜溃疡模型,观察加替沙星点眼的疗效及其对兔眼的刺激性,为眼科临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康大耳白兔 21 只(西安交通大学医学院实验动物中心提供),体重 2~2.5 kg,雌雄不限。6 只兔进行眼刺激性评估实验,其余 15 只兔分为 3 组,每组 5 只(10 只眼),即 0.3% 加替沙星、0.3% 氧氟沙星和生理盐水组。实验前裂隙灯显微镜眼部检查无异常。

1.1.2 菌株 选用金黄色葡萄球菌标准菌株,菌种号 ATCC94532(西安交通大学第二医院细菌室提供)。接种密度 3×10^8 /mL,菌液接种前 24 h 种入葡萄糖肉汤管增菌,麦氏比浊仪测定细菌数后无菌操作下加无茵生理盐水配制所需浓度。

1.1.3 药物及仪器 0.3% 加替沙星(批号:030726,四川倍达尔新技术开发公司),每瓶 8 mL:24 mg。0.3% 氧氟沙星(批号:030726,徐州莱恩药业公司),每瓶 8 mL:24 mg。裂隙灯显微镜 2 台(日本 Topcon 公司,瑞士 HAAG-STREIT-LIEBEFELD-BERN 公司)用于拍照和每日检查。麦氏比浊仪(意大利 BIO Merieux DENSIC HEK 公司)。

1.2 方法

1.2.1 角膜溃疡动物模型的制作 3 组动物倍诺喜滴眼液点眼 3 次行表面麻醉,4 号半针头将 0.1 mL 密度为 3×10^8 /mL 的金黄色葡萄球菌液自角膜近中央处注入角膜实质层 1/3~1/2 深度,形成 4.0~6.0 mm 直径乳白色水泡。接种细菌 24 h 后开始给药,每日 6 次,每次 2 滴(100 μ L),间隔 2 h,持续 18 d。双眼接受相同治疗。

1.2.2 裂隙灯显微镜下观察 2% 荧光素钠角膜染色每日裂隙灯显微镜下观察,并用眼前节照相裂隙灯显微镜等倍(16 \times)逐一摄片(钴蓝光)记录,扫描仪扫描后,用 Photoshop 6.0 软件将照片缩放到与原始兔眼 1:1 比例大小,用网格法计算照片上角膜病灶着色部分的面积。病变观察指标:结膜充血、结膜水肿、分泌物、角膜浸润灶面积、实质病变程度、新生血管、前房渗出、前房积脓、房水闪辉、角膜后沉着物、虹膜充血、虹膜水肿、瞳孔大小、形状、对光反射等,其中以角膜溃疡面积评分作为病变观察的主要指标。评分标准采用 Trousdale 评分法^[2]。

1.2.3 结膜囊细菌培养 接种第 18 天生理盐水冲洗分泌物,无菌条件下用棉拭子涂抹兔眼结膜囊,葡萄糖肉汤管中进行增菌 24 h,平板划线法接种于血液琼脂平板中进行细菌培养,24 h 后观察有无菌落。

1.2.4 组织病理学检查 接种第 18 天分别从各组取 1 只兔角膜,置于 10% 甲醛中固定,2 d 后冰冻切片,苏木精-伊红染色观察。

1.2.5 眼刺激性评估 健康大耳白兔 6 只,左眼点 0.3% 加替沙星,右眼点生理盐水。连续 7 d,每次 2 滴(100 μ L),每日 6 次。用药后 6 h 及第 1、2、3、4、5、6、7 天裂隙灯显微镜下观察,记录眼部反应情况并评分。评分标准采用 Draize 评分法^[2]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计学软件进行统计学分析。实验测试指标数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。3 个组用药后角膜溃疡面积变化的比较采用单因素方差分析,各组间的两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 加替沙星滴眼疗效观察

接种细菌 24 h,全部家兔双眼均出现明显的炎症反应,中量白色较黏稠分泌物使眼睑和睫毛黏着,角膜浸润灶呈圆形或不规则形,深达基质层。病变首先从针尖穿刺处开始形成。

2.1.1 加替沙星组 接种第 1 天,角膜病变发展为圆形、类圆形或不规则形深浅不一的灰白色浓密浸润灶,基质水肿、混浊。角膜溃疡面积迅速扩大,大部分病变在第 3~6 天达到高峰,此后大部分角膜溃疡呈现自愈趋势,部分溃疡加重。虹膜炎发生率为 100%,前房积脓发生率为 60%。接种第 6 天全部角膜开始出现新生血管,第 15 天以后角膜新生血管开始萎缩(图 1)。无角膜穿孔或角膜大泡出现。

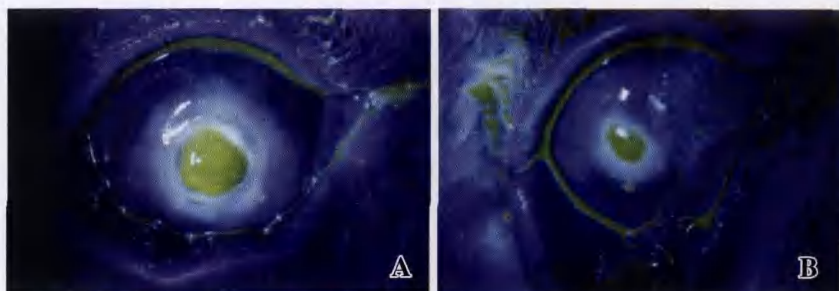


图 1 裂隙灯观察加替沙星组 A:接种后 6 d B:接种后 18 d

Fig. 1 In gatifloxacin group, corneal ulcer peaked in the sixth day, showing large corneal ulcer area, stronger fluoresceence and dense infiltration, matrix swelling and opacity. The corneal ulcer showed a self-healing trend in the eighteen day under slit lamp microscope (cobalt blue light irradiation)

2.1.2 氧氟沙星组 角膜溃疡在第3~6天达到高峰,此后溃疡面积逐渐减小,基质水肿、混浊减轻,部分角膜溃疡加重。兔眼结膜病变、虹膜炎、前房积脓、角膜新生血管均类似于加替沙星组(图2)。无角膜穿孔或角膜大泡出现。

2.1.3 生理盐水组 3只眼角膜穿孔,2只眼出现角膜大泡(图3)。接种第1天,加替沙星组、氧氟沙星组和生理盐水组角膜溃疡面积比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。第3、6、9、12、15、18天3组之间比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$),3组之间两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)(表1)。

表1 各组用药后角膜溃疡面积的比较($\bar{x} \pm s, \text{mm}^2, n = 30$)

Table 1 Comparison of corneal ulcer area in different medicine groups($\bar{x} \pm s, \text{mm}^2, n = 30$)

Group	Corneal ulcer area in different time after medicine						
	1 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d
Gatifloxacin	13.72 ± 8.07	9.09 ± 2.57	7.81 ± 2.11	6.09 ± 0.97	3.22 ± 1.27	1.89 ± 1.06	0.92 ± 0.73
Ofloxacin	11.72 ± 9.67	8.05 ± 2.45 ^e	7.35 ± 1.71 ^e	6.15 ± 2.57 ^e	3.99 ± 2.00 ^e	2.80 ± 1.50 ^e	1.56 ± 0.72 ^e
Saline	8.73 ± 8.79	15.87 ± 8.30 ^{ef}	17.07 ± 7.81 ^{ef}	13.73 ± 5.77 ^{ef}	11.09 ± 4.66 ^{ef}	5.05 ± 0.99 ^{ef}	3.00 ± 1.14 ^{ef}
F	0.80	6.64	13.22	14.17	20.66	18.08	14.60
P	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

^e $P < 0.01$ vs respective gatifloxacin group, ^f $P < 0.01$ vs respective ofloxacin group(ANOVA, SNK-q test)

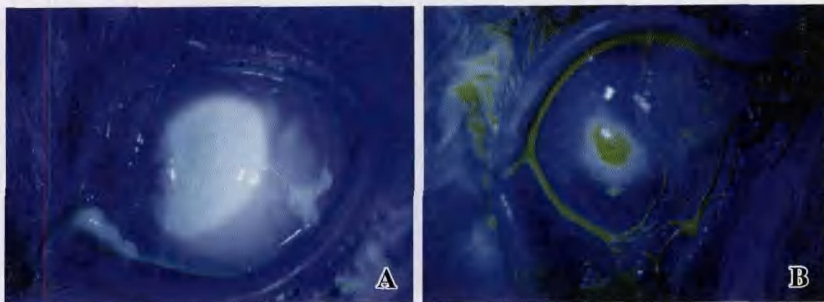


图2 裂隙灯观察氧氟沙星组 A:接种后6d B:接种后18d
Fig.2 In ofloxacin group, corneal ulcer reached the peak in the sixth day. Then the ulcer size, stromal edema and turbidity gradually decreased. The change of lesion was similar to that in gatifloxacin group

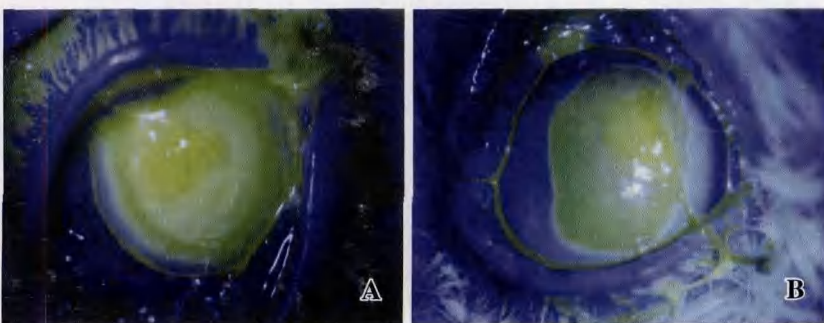


图3 裂隙灯观察0.9%生理盐水组 A:接种后6d B:接种后18d
Fig.3 In 0.9% saline group compared with other two groups, corneal ulcer was worst, showing large ulcer size, severe stromal edema, even 3 corneal perforations and 2 bullous keratopathy from 6 days through 18 days

2.2 组织病理学检查

接种第18天加替沙星组角膜溃疡灶上皮层基本完整且较光滑,为新生复层鳞状上皮所覆盖。实质层轻度水肿,板层排列较整齐,有肉芽组织和新生血管形成及淋巴细胞浸润。氧氟沙星组角膜溃疡基本愈合,尚有小部分未被新角膜上皮覆盖,角膜各层结构模糊,板层分离,有较多肉芽组织和新生血管形成及淋巴细胞、单核细胞浸润。生理盐水组角膜溃疡灶未愈合。角膜全层可见弥漫性炎症,明显水肿增厚,各层结构模糊。实质层板层间分离、排列紊乱,并有大量肉芽组织、新生血管形成和中性白细胞、淋巴细胞浸润(图4)。

2.3 眼刺激性

0.3%加替沙星和生理盐水滴眼7d,每日6次,眼刺激性评分均为0分,均未引起角膜混浊、虹膜充血、肿胀、结膜充血、水肿及眼部分泌物等表现。

3 讨论

加替沙星是8-甲氧基氟喹诺酮C₇位用3-甲基哌嗪基取代的衍生物,分子式为C₁₉H₂₂FN₃O₄,7位上的3-甲基哌嗪基改善对革兰阴性菌的抗菌活性、提高口服吸收率、延长血浆清除半衰期,8位上甲氧基增强了对革兰阳性菌及厌氧菌的抗菌作用,同时也降低了光毒性^[3]。

目前,国外加替沙星主要应用于分枝杆菌性角膜溃疡、角膜屈光手术、白内障手术和其他内眼手术后的抗感染治疗。对于细菌性结膜炎,加替沙星的治疗率明显高于第3代氟喹诺酮类药物氧氟沙星组,同时很少发生细菌耐药。加替沙星体外抗菌活性表明,对革兰阳性菌的抗菌活性强于诺氟沙星、环丙沙星和氧氟沙星,但对革兰阴性菌的抗菌活性稍弱于环丙沙星。体内实验中,加替沙星对革兰阳性球菌的疗效是环丙沙星的4~8倍,对革兰阴性杆菌的疗效与环丙沙星相当,对肺炎克雷伯杆菌和铜绿假单胞菌感染肺炎的疗效是环丙沙星和氧氟沙星的2~4倍。第1代氟喹诺酮类抗菌药物对大部分厌氧菌活性较低,而加替沙星由于8位甲氧基的引入,增强了对厌氧菌的活性^[4]。

金黄色葡萄球菌性角膜溃疡进展迅

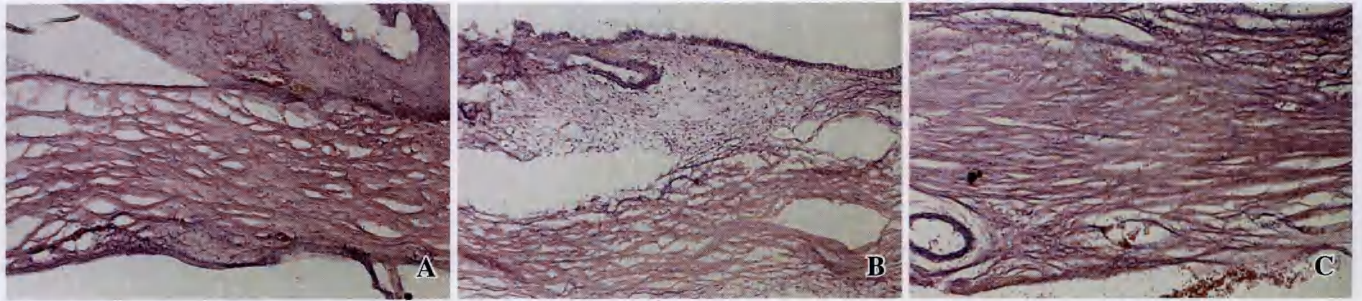


图 4 接种 18 d 角膜冰冻切片组织病理学检查 (HE × 100) A: 加替沙星组 B: 氧氟沙星组 C: 0.9% 生理盐水组

Fig. 4 Corneal histopathology in 18 days after inoculation (HE × 100) A: In gatifloxacin group, corneal ulcer was repaired, and corneal ulcer was covered by stratified squamous epithelium. The corneal epithelium was integral and smooth. Corneal stroma showed mild edema. Granulation tissue, angiogenesis and lymphocyte infiltration were seen under the optical microscope B: In ofloxacin group, corneal ulcer was healed. A small part of cornea were not covered by neoepithelium. Ambiguity of corneal layers, lamellar separation, and the formation of angiogenesis, more granulation tissue, lymphocytes, mononuclear cell infiltration were exhibited C: In 0.9% saline group, corneal ulcer lesion was still existed. Visible diffuse inflammation occurred in full-thickness cornea, and corneal stroma was evidently thicker. Rupture and disorder of lamellar layers, a large number of granulation tissue, angiogenesis, and neutrophil and lymphocyte infiltration were seen

速,若未得到及时有效的治疗,将会导致角膜穿孔、视力丧失等严重后果。金黄色葡萄球菌是眼科常见致病菌,属凝固酶阳性葡萄球菌,主要通过外毒素致病。可见于正常结膜囊,正常免疫情况下暂时存在。当角膜上皮有损伤或因其他疾病等原因使机体抵抗力降低时,侵入角膜使局部感染^[5]。

与生理盐水组比较,0.3% 氧氟沙星组和 0.3% 加替沙星组均可使角膜病变得得到控制,缩小角膜溃疡的面积。实验结果显示,0.3% 氧氟沙星组和 0.3% 加替沙星组对兔眼金黄色葡萄球菌性角膜溃疡均有治疗效果,0.3% 加替沙星疗效优于 0.3% 氧氟沙星。

生理盐水组与 0.3% 加替沙星组、0.3% 氧氟沙星组与 0.3% 加替沙星组之间角膜溃疡面积比较差异均有统计学意义,表现为角膜溃疡面积生理盐水组大于 0.3% 氧氟沙星组,0.3% 氧氟沙星组大于 0.3% 加替沙星组。接种 18 d 内,生理盐水组与 0.3% 加替沙星组、0.3% 氧氟沙星组与 0.3% 加替沙星组之间结膜病变评分差异均有统计学意义,表现为结膜病变评分生理盐水组大于 0.3% 氧氟沙星组,0.3% 氧氟沙星组大于 0.3% 加替沙星组。

加替沙星口服和静脉制剂在人体内的耐受性良好,与其他常见氟喹诺酮类药物相比不良反应发生率较低,有胃肠道反应、神经系统反应、肝功能改变等^[6]。本实验选用 0.3% 加替沙星,在正常活体家兔角膜上连续点眼进行眼部刺激性实验,结果表明 0.3% 加替沙星组无眼部刺激性。

参考文献

- 1 Abshire R, Cockrum P, Clider J. Topical antibacterial therapy for mycobacterial keratitis; Potential for surgical prophylaxis and treatment [J]. Clin Therapeut, 2004, 2: 26
- 2 张晓辉,孙乃学,郭绒霞,等. 土贝母皂甙对单疱病毒性角膜炎作用的实验研究 [J]. 眼科新进展, 2002, 22(12): 373 - 377
- 3 Franca SA, Carvalho CR. Effectiveness, safety and tolerability of gatifloxacin, a new 8-methoxyfluoroquinolone, in the treatment of outpatients with community-acquired pneumonia: a Brazilian study [J]. Braz J Infect Dis, 2002, 6(4): 157 - 163
- 4 孙声桃,马新峰,张月琴,等. 四种氟喹诺酮类药物对眼部分离细菌的体外敏感试验 [J]. 眼科研究, 2005, 23(12): 610 - 613
- 5 Schaefer F, Bruttin O. Bacterial keratitis: a prospective clinical and microbiological study [J]. Br J Ophthalmol, 2001, 85(7): 842 - 847
- 6 马越,金少鸿. 氟喹诺酮类抗生素的发展 [J]. 国外医学·药学分册, 2001, 28(4): 240 - 243

(收稿: 2008-12-08 修回: 2009-08-17)

(本文编辑: 王莉红)

读者·作者·编者

本刊关于欢迎短篇文稿的启事

本刊除设有长篇论著栏目如实验研究、临床研究、调查研究等外,还设有短篇栏目,如短篇论著、临床经验、调查报告(家系报告)、技术方法、病例报告等。由于版面原因,短篇文稿滞留周期短,发表快。欢迎作者踊跃投稿! 论著简报、临床经验、调查报告、技术方法等文稿字数要求在 1 500 字内;病例报告在 1 000 字内。

欢迎赐稿,短小精悍的短篇文稿将优先刊登。

(本刊编辑部)