

基于两性霉素B和氟康唑治疗基础上的 真菌性角膜炎发病机制探究

张晓倩

新疆医科大学第一附属医院重症医学科, 新疆 乌鲁木齐

收稿日期: 2024年3月11日; 录用日期: 2024年4月4日; 发布日期: 2024年4月12日

摘要

目的: 在两性霉素B和氟康唑治疗基础上探究真菌性角膜炎发病机制探究。方法: 分析比较2021年12月至2023年12月我院收治的54例(54只眼)真菌性角膜炎患者经两性霉素B联合氟康唑交替滴眼治疗前及治疗后2 d、4 d、15 d、30 d患者血清中IL-1、IL-6、TNF- α 、Dectin-1、Nrf2、HO-1的表达水平。结果: 与用药前比较, 用药后2 d, IL-1、IL-6、TNF- α 、Dectin-1血清水平下降, Nrf2、HO-1水平上升, 但差异未达到统计学意义, 用药后4 d开始, 血清IL-1、IL-6、TNF- α 、Dectin-1水平下降, 及Nrf2、HO-1上升水平均较用药前有统计学意义。结论: 角膜感染真菌后, Dectin-1促进角膜病变进展, Nrf2、HO-1促进角膜恢复。

关键词

真菌性角膜炎, 两性霉素B, 氟康唑, Dectin-1, Nrf2, HO-1

Pathogenesis of Fungal Keratitis Based on Amphotericin B and Fluconazole Therapy

Xiaoqian Zhang

Department of Intensive Care Unit, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang

Received: Mar. 11th, 2024; accepted: Apr. 4th, 2024; published: Apr. 12th, 2024

Abstract

Objective: To explore the pathogenesis of fungal keratitis on the basis of amphotericin B and fluconazole. **Methods:** The expression levels of IL-1, IL-6, TNF- α , Dectin-1, NRF2 and HO-1 in serum of 54 patients (54 eyes) with fungal keratitis admitted to our hospital from December 2021 to De-

ember 2023 were analyzed and compared before and after alternating eye drops of amphotericin B combined with fluconazole for 2 d, 4 d, 15 d and 30 d. Results: Compared with before medication, the serum levels of IL-1, IL-6, TNF- α and Dectin-1 decreased 2 days after medication, while the levels of Nrf2 and HO-1 increased, but the difference was not statistically significant. From 4 days after medication, the serum levels of IL-1, IL-6, TNF- α and Dectin-1 decreased, and also the levels of Nrf2 and HO-1 increased, all of which were statistically significant compared with before medication. Conclusion: Dectin-1 promotes the progression of keratopathy and NRF2 and HO-1 promote corneal recovery after corneal fungal infection.

Keywords

Fungal Keratitis, Amphotericin B, Fluconazole, Dectin-1, Nrf2, HO-1

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

真菌性角膜炎(fungal keratitis, FK)是最具破坏性的微生物性角膜炎之一, 视力预后最差, 可致盲[1][2]。真菌性角膜炎的病因包括植物性外伤史、角膜手术史、长期使用抗生素导致眼表菌群失调、隐形眼镜长期佩戴史、干眼症病史、糖皮质激素长期使用史等。真菌性角膜炎的临床症状不典型, 缺乏可靠的诊断方法, 所以不能对真菌性角膜炎进行早期诊断和治疗, 许多患者就诊时已发生严重并发症[3], 如眼前房积脓、青光眼、虹膜萎缩、白内障、角膜溶解、角膜穿孔和内膜炎。由于真菌性角膜炎病程的顽固性及误用抗真菌药, 真菌性角膜炎对抗真菌药的反应性较差, 更有患者需要行角膜移植成形术, 真菌性角膜炎的诊断和治疗是眼科医师面临的最困难的难题之一。

目前 FK 的治疗主要是以两性霉素 B 为代表的多烯类, 联合以氟康唑为代表的咪唑类。本研究基于在两性霉素 B 联合氟康唑治疗真菌性角膜炎基础上探究 FK 的发病机制, 旨在为真菌性角膜炎提供新的治疗靶点。

2. 资料与方法

2.1. 临床资料

前瞻性收集我院自 2021 年 12 月至 2023 年 12 月我院收治的 54 例确诊为真菌性角膜炎病例, 所有病例均为单眼患病。纳入标准: ① 明确诊断为真菌性角膜炎, 临床症状较典型, ② 知情同意此项前瞻性研究。排除标准: ① 拒绝配合此项研究, ② 合并其他炎症性疾病, 如细菌性角膜炎、结膜炎、全身或其他部位有感染性疾病, ③ 合并有慢性消耗性疾病。随访 1 个月后, 整理数据, 剔除对两性霉素 B 联合氟康唑治疗无效的病例, 最后共纳入 54 例病例, 其中, 男性 34 例, 女性 20 例, 年龄 32~68 岁, 平均年龄 53.2 ± 5.6 岁; 按照真菌性角膜炎病情分级标准, 轻度 18 例, 中度 27 例, 重度 9 例, 植物性外伤史 22 例, 角膜手术史 3 例, 干眼症病史 9 例, 糖皮质激素使用史 12 例, 隐形眼镜长期佩戴史 10 例; 镰刀菌感染 30 例, 曲霉菌感染 19 例, 念珠菌感染 5 例。

2.2. 诊断依据

① 存在发生真菌性角膜炎的病因; ② 症状轻, 角膜病变重; ③ 裂隙灯下检查角膜溃疡面呈灰白色, 微隆起, 表面干而粗糙, 常伴有前房积脓; ④ 显微镜下找到菌丝或真菌培养阳性。

2.3. 疗效评价标准

痊愈：治疗后眼前房无积脓，无角膜溃疡，经真菌镜检为阴性；有效：疗程结束后眼前房积脓、角膜溃疡明显减少，经真菌镜检为阴性；无效：疗程结束后眼前房积脓、角膜溃疡症状无明显改善。

2.4. 治疗

所有患者入院后先取静脉血以备后续 ELISA 检测用，再取角膜分泌物行真菌培养，给与手术清创治疗，刮除溃疡表面的坏死组织和菌丝苔被，之后用 5% 碘酒烧灼溃疡面，再用生理盐水冲洗，同时予以散瞳剂、口服角膜营养药物。术后给与 2.5% 两性霉素 B 滴眼液、0.2% 氟康唑滴眼液轮流滴眼，1 次/h，两滴眼液间隔时间 5 min，连续治疗 1 个月。

2.5. 实验方法及指标

分别取患者入院后及用药 2 天、4 天、15 天、30 天后的静脉血，行 ELISA 检测 IL-1、IL-6、TNF- α 、树突状细胞相关性 C 型植物血凝素 1 (Dectin-1)、核因子 E2 相关因子(Nrf2)、血红素加氧酶 1(HO-1)。

2.6. 统计方法

采用 SPSS19.0 统计学软件对数据进行统计分析，计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析，计数资料用 n (%)表示。检验水准 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3. 结果

3.1. 临床症状恢复时间

如表 1 所示，用药前所有病例均有异物感、前房脓肿、畏光流泪、角膜溃疡症状，经治疗 15 d 后，还有 5 例有异物感、8 例有前房脓肿、16 例畏光流泪、13 例角膜溃疡患者；治疗 30 d 后，所有患者异物感及前房脓肿症状均缓解，还有 1 例异物感、2 例畏光流泪患者。所有患者用药 30 d 后，均达到临床治愈。图 1~4 分别为治疗前、治疗后 4 d、15 d、30 d 效果图。

3.2. 视力恢复时间

如表 2 所示，用药前，视力 < 0.3 的患者有 26 例，0.3~0.5 的患者有 23 例，0.6~0.9 的患者有 5 例，

Table 1. Recovery time of clinical symptoms

表 1. 临床症状恢复时间

	异物感	前房脓肿	畏光流泪	角膜溃疡
用药前(n)	54	54	54	54
用药后 15 d (n, %)	5 (9.26)	8 (14.81)	16 (29.63)	13 (24.07)
用药后 30 d (n, %)	1 (1.85)	0	2 (3.70)	0

Table 2. Vision recovery time

表 2. 视力恢复时间

	< 0.3	0.3~0.5	0.6~0.9	≥ 1.0
用药前(n)	26 (48.15)	23 (42.59)	5 (9.25)	0
用药后 15 d (n, %)	12 (37.03)	14 (37.03)	20 (20.37)	9 (5.56)
用药后 30 d (n, %)	6 (11.11)	10 (33.33)	18 (37.03)	20 (18.52)



Figure 1. Before medication
图 1. 用药前



Figure 2. 4 d after medication
图 2. 用药后 4 d



Figure 3. 15 days after treatment
图 3. 治疗后 15 d



Figure 4. 30 days after treatment
图 4. 治疗后 30 d

Table 3. Expression levels of serum inflammatory factors
表 3. 血清炎症因子表达水平

	IL-1 β	IL-6	TNF- α	Dectin-1	Nrf2	HO-1
用药前	1.20 \pm 0.37	1.48 \pm 0.42	0.83 \pm 0.29	1.69 \pm 0.46	0.63 \pm 0.15	0.72 \pm 0.15
用药后 2 d	1.07 \pm 0.29	1.54 \pm 0.36	0.98 \pm 0.36	1.55 \pm 0.37	0.68 \pm 0.23	0.69 \pm 0.21
用药后 4 d	0.96 \pm 0.33*	1.36 \pm 0.27*	0.78 \pm 0.26*	1.46 \pm 0.32*	0.78 \pm 0.32*	0.77 \pm 0.17*
用药后 15 d	0.79 \pm 0.42**	1.03 \pm 0.18**	0.61 \pm 0.35*	1.28 \pm 0.22*	1.06 \pm 0.27***	0.92 \pm 0.24**
用药后 30 d	0.62 \pm 0.21***	0.91 \pm 0.24***	0.52 \pm 0.29***	0.94 \pm 0.14***	1.23 \pm 0.16***	0.97 \pm 0.32***

与用药前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

没有视力 ≥ 1.0 的患者; 经治疗 15 d 后, 视力 < 0.3 的患者减少了 14 例, 视力处于 0.3~0.5 的患者减少了 9 例, 视力为 0.6~0.9 的患者增加了 15 例, 视力 ≥ 1.0 的患者增加了 9 例; 经治疗 30 d 后, 视力 < 0.3 的患者有 6 例, 较用药前减少了 20 例, 视力 0.3~0.5 的患者 10 例, 较用药前减少了 13 例, 视力 0.6~0.9 的患者 18 例, 较用药前增加了 13 例, 视力 ≥ 1.0 的患者有 20 例。

3.3. 血清中炎症因子表达水平

如表 3 所示, 与用药前对比, 用药 2 d 后, IL-1 β 、Dectin-1 水平下降, 但差异无统计学意义, IL-6、TNF- α 、Nrf2、HO-1 水平升高, 差异无统计学意义; 用药 4 d 后, IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、Dectin-1 均下降, 且下降水平较用药前差异有统计学意义, Nrf2、HO-1 水平上升, 与用药前比较, 差异有统计学意义。用药后 15 d、30 d, IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、Dectin-1 水平持续下降, Nrf2、HO-1 持续上升。

4. 讨论

真菌性角膜炎在眼科领域是一个巨大的挑战, 由于其病程长, 无特定抗菌药物, 其治疗是临床一个很棘手的问题, 严重者可致盲。目前首选治疗方法是眼局部使用广谱抗真菌药。有研究指出, 真菌性角膜炎发生发展的一个重要的原因是感染真菌后激发的过度的固有免疫反应, 其招募各种炎症因子和免疫细胞, 促进蛋白质沉淀, 降低角膜透明度[4] [5] [6]。真菌性角膜炎发病机制的研究有助于为临床治疗开辟新的思路, 但是目前的研究都集中在动物实验中, 本研究基于临床使用两性霉素 B 联合氟康唑治疗真菌性角膜炎的基础上, 浅谈真菌性角膜炎的发病机制。

真菌性角膜炎的发生发展与免疫炎症反应密切相关。模式识别受体(PRR)识别病原体中的病原体相关分子模式(PAMP), 并招募中性粒细胞, 释放炎症因子[7]。其中, IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 与真菌性角膜炎的发病至关重要[8] [9]。炎症因子的释放水平与真菌性角膜炎的严重程度成正比[10]。然而, 过度的免疫炎症反应可导致蛋白质沉淀, 降低角膜透明度[11]。因此, 控制免疫炎症反应, 抑制炎症因子的释放对于保持角膜透明度非常重要[12]。Dectin-1 是种 β 葡萄糖受体, 被广泛认为是真菌性角膜炎中最特异的一种模式识别受体[13], 专门识别真菌性角膜炎中的 β 葡聚糖, 刺激组织液中的白介素 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子的产生, 进而使宿主实现免疫防御作用[14]。但是, Dectin-1 总是引起过度的炎症反应, 导致组织损伤, 不利于角膜修复和真菌清除[15]。有报道指出, 抑制 Dectin-1 可缓解真菌性角膜炎[16]。核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)/血红素加氧酶-1 (HO-1)是抗过氧化物的重要蛋白, 参与抑制角膜蛋白氧化应激的先天性免疫反应[17]。Nrf2/HO-1 通路被激活后, 可以减轻炎症反应, 促进角膜伤口愈合[18]。

本研究基于上述理论, 在临床上使用两性霉素 B 联合氟康唑治疗真菌性角膜炎基础上, 证实了 Dectin-1 及炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 促进了真菌性角膜炎疾病的发展, 两性霉素 B 联合氟康唑有效

治疗真菌性角膜炎后,上述蛋白水平下降,同时,Nrf2、HO-1水平上升。本实验研究表明,抑制Dectin-1,促进Nrf2-HO-1的表达,可缓解真菌性角膜炎,这为临床治疗真菌性角膜炎提供了新的思路。但仍有许多不足之处,本研究样本量较少,且仅局限于临床症状的观察,未深入其中机制研究,后续仍需对其作用分子机制进一步研究,为临床药物使用提供新的思路。

参考文献

- [1] Kredics, L., Narendran, V., Shobana, C.S., *et al.* (2015) Filamentous Fungal Infections of the Cornea: A Global Overview of Epidemiology and Drug Sensitivity. *Mycoses*, **58**, 243-260. <https://doi.org/10.1111/myc.12306>
- [2] Sharma, Y., Jain, S. and Jayachandran (2014) Keratomycosis: Etiology, Risk Factors and Differential Diagnosis—A Mini Review on Trichophyton spp. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, **8**, No. 10. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/9029.5044>
- [3] 王俊, 王宇, 彭柿杰, 等. PCR 检测技术在真菌性角膜炎快速诊断中的应用[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(9): 1183-1185.
- [4] Venkatesh Prajna, N., Krishnan, T., Mascarenhas, J., *et al.* (2012) Predictors of Outcome in Fungal Keratitis. *Eye*, **26**, 1226-1231. <https://doi.org/10.1038/eye.2012.99>
- [5] Ray, K.J., Prajna, V., Lalitha, P., *et al.* (2018) The Significance of Repeat Cultures in the Treatment of Severe Fungal Keratitis. *American Journal of Ophthalmology*, **189**, 41-46. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2018.02.003>
- [6] Sharma, N., Sahay, P., Maharana, P.K., *et al.* (2018) Management Algorithm for Fungal Keratitis: The TST (Topical, Systemic, and Targeted Therapy) Protocol. *Cornea*, **38**, 141-145. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001781>
- [7] Redfern, R.L. and McDermott, A.M. (2010) Toll-Like Receptors in Ocular Surface Disease. *Experimental Eye Research*, **90**, 679-687. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2010.03.012>
- [8] Leal Jr, S.M., Cowden, S., Hsia, Y.C., *et al.* (2010) Distinct Roles for Dectin-1 and TLR4 in the Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* Keratitis. *PLOS Pathogens*, **6**, e1000976. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000976>
- [9] Sun, L., Chen, C., Wu, J.Y., *et al.* (2018) TSLP-Activated Dendritic Cells Induce T Helper Type 2 Inflammation in *Aspergillus fumigatus* Keratitis. *Experimental Eye Research*, **171**, 120-130. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.03.014>
- [10] Weindl, G., Wagener, J. and Schaller, M. (2011) Interaction of the Mucosal Barrier with Accessory Immune Cells during Fungal Infection. *International Journal of Medical Microbiology*, **301**, 431-435. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.011>
- [11] Mukwaya, A., Lennikov, A., Xeroudaki, M., *et al.* (2018) Time-Dependent LXR/RXR Pathway Modulation Characterizes Capillary Remodeling in Inflammatory Corneal Neovascularization. *Angiogenesis*, **21**, 395-413. <https://doi.org/10.1007/s10456-018-9604-y>
- [12] Cheng, M., Lin, J., Li, C., *et al.* (2019) Wedelolactone Suppresses IL-1 β Maturation and Neutrophil Infiltration in *Aspergillus fumigatus* Keratitis. *International Immunopharmacology*, **73**, 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.04.050>
- [13] Iliev, I.D., Funari, V.A., Taylor, K.D., *et al.* (2012) Interactions between Commensal Fungi and the C-Type Lectin Receptor Dectin-1 Influence Colitis. *Science*, **336**, 1314-1317. <https://doi.org/10.1126/science.1221789>
- [14] Taylor, P.R., Brown, G.D., Botto, M., *et al.* (2007) Dectin-1 Is Required for Beta-Glucan Recognition and Control of Fungal Infection. *Nature Immunology*, **8**, 31-38.
- [15] Lee, J.E., Sun, Y., Gjorstrup, P., *et al.* (2015) Inhibition of Corneal Inflammation by the Resolving E1. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **56**, 2728-2736. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15982>
- [16] Zhou, J., Huang, W.L., Deng, Q.C., *et al.* (2016) Inhibition of TREM-1 and Dectin-1 Alleviates the Severity of Fungal Keratitis by Modulating Innate Immune Responses. *PLOS ONE*, **11**, e0150114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150114>
- [17] Kobayashi, E.H., Suzuki, T., Funayama, R., *et al.* (2016) Nrf2 Suppresses Macrophage Inflammatory Response by Blocking Proinflammatory Cytokine Transcription. *Nature Communications*, **7**, Article 11624. <https://doi.org/10.1038/ncomms11624>
- [18] Hayashi, R., Himori, N., Taguchi, K., *et al.* (2013) The Role of the Nrf2-Mediated Defense System in Corneal Epithelial Wound Healing. *Free Radical Biology & Medicine*, **61**, 333-342. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.008>