

茶树油眼用凝胶和甲硝唑滴眼液体外抗螨作用比较

韩雷¹, 皇甫赞², 王应飞¹, 张俊杰¹, 王丽娅^{1*}

(1. 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所, 郑州 450003; 2. 河南医学高等专科学校, 郑州 451191)

[摘要] 目的:探讨5%茶树油凝胶、2%甲硝唑滴眼液2种制剂对毛囊蠕形螨的体外杀灭作用,为选择有效的灭螨方法提供依据。方法:在本院眼科门诊用睫毛拔取法采集眼部毛囊蠕形螨,置于细胞板中,滴加5%茶树油凝胶、2%甲硝唑滴眼液,利用倒置显微镜观察其存活情况,生理盐水为空白对照。结果:5%的茶树油凝胶对毛囊蠕形螨有较好的杀灭作用,虫体形态及活动度均发生了兴奋-痉挛-松弛-死亡的典型变化。毛囊蠕形螨在5%茶树油凝胶中的存活时间平均为(1.43±0.62)h,与2%甲硝唑滴眼液组的平均存活时间(27.65±5.14)h比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。毛囊蠕形螨在3组间的存活时间经 H 检验,差异有统计学意义($P < 0.01$)。其中,毛囊蠕形螨在2%甲硝唑滴眼液中的存活时间与空白对照组的平均存活时间(23.33±3.98)h比较差异无统计学意义。毛囊蠕形螨在5%茶树油凝胶与空白对照组的存活时间比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。在5%茶树油凝胶、2%甲硝唑滴眼液和空白对照组间,毛囊蠕形螨24h死亡率分别为100%,20%,50%,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结论:2%甲硝唑滴眼液对毛囊蠕形螨无体外杀灭作用;5%茶树油凝胶对毛囊蠕形螨有体外杀灭作用。茶树油凝胶制剂可作为一种天然高效的杀螨药物。

[关键词] 茶树油凝胶; 甲硝唑滴眼液; 毛囊蠕形螨; 存活时间; 24h死亡率

[中图分类号] R287.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0188-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180188

An Experiment Study of Killing Ocular Demodex *in vitro* with Tea Tree Oil Ocular Gel and Arilin Eye Drops

HAN Lei¹, HUANG Fu-yun², WANG Ying-fei¹, ZHANG Jun-jie¹, WANG Li-ya^{1*}

(1. Henan Eye Hospital & Henan Eye Institute, Zhengzhou 450003, China;

2. Henan Medical College, Zhengzhou 451191, China)

[Abstract] **Objective:** The purpose of this study was to compare the acaricidal effect of 5% tea tree oil gel and 2% arilin eye drops on the ocular *Demodex folliculorum*. **Method:** Eyelash samples were epilated from outpatient of ophthalmology to collect ocular *D. folliculorum*, transferred into 6-well plates and examined under the inverted microscope. Each well contained at least 20 live mites which were collected and treated with 5% tea tree oil gel and 2% arilin eye drops, respectively, with normal saline as blank control. **Result:** 5% tea tree oil gel was demonstrated to show better killing effect on the mite *in vitro*. After drug treatment, the morphology and activity of *D. folliculorum* altered with typical changes of excitation-spasm-chalasia-death. In the treatment of 5% tea tree oil gel, the average survival time of mites was (1.43±0.62) h, while in 2% arilin eye treatment, it was (27.65±5.14) h, with a significant difference between them ($P < 0.01$). The survival times of mites, showed significant difference among the three groups ($P < 0.01$). The survival time of *D. folliculorum* in normal saline group was (23.33±3.98) h, which had significant difference from the 5% tea tree oil gel group ($P < 0.01$); while in the 2% arilin eye drops group the survival time was (27.65±5.14) h, compared with the survival time of control group, there was no significant difference between them. The mortality of mites within 24 hours in 5% tea tree oil

[收稿日期] 20140430(002)

[基金项目] 河南省科技厅研究开发专项基金项目(豫科攻072103810601);河南医学科技攻关项目(豫卫科200703092)

[第一作者] 韩雷,在读博士,助理研究员,从事眼科微生物研究,Tel:15937121171,E-mail:hanlei2013ray@163.com

[通讯作者] *王丽娅,教授,博士生导师,从事眼科角膜病的临床与科研工作,E-mail:wangliya55@126.com

gel, 2% arilin eye drops and control group were 100%, 20% and 50% respectively, and there was a significant difference between them ($P < 0.01$). **Conclusion:** 2% arilin eye drops has no effect on killing *D. folliculorum in vitro*, while 5% tea tree oil gel has the killing effect on *D. folliculorum in vitro*. Tea tree oil gel could be developed as a natural drug to kill ocular *D. folliculorum* in high-efficiency.

[**Key words**] tea tree oil ocular gel; arilin eye drops; *Demodex folliculorum*; survival time; mortality within 24 hours

毛囊蠕形螨 *Demodex folliculorum* 是一种常见小型人体寄生螨虫,可寄生在眼睑睫毛毛囊内,破坏毛囊及皮脂腺,导致眼表局部油脂分泌障碍,继而引发睑缘炎、干眼症等眼表疾病^[1-2]。给人们的日常生活带来诸多不便,由于人群中带虫率较高,眼科医师急需寻找一种安全高效、价格低廉的眼用杀虫药物^[3]。传统的治疗方法是使用 2% 甲硝唑滴眼液,杀虫效率低,且长期使用该药,易导致结膜囊菌群失调。茶树精油^[4] (tea tree oil essence, TTO) 是从桃金娘科互叶白千层 *Melaleuca alternifolia* 枝叶中榨取的植物精油。天然不刺激,其有效活性成分渗透力强,可以迅速透入毛囊、皮脂腺等表皮组织,是迄今为止发现的最强有力的天然抗菌剂^[5-6]。国外学者 Koo H 等^[7] 报道将茶树精油洗液用于临床眼表抗螨治疗,收到较好的疗效,但眼表刺激性较大,病人不易接受。本实验通过剂型改造创新,将茶树油中加入卡波姆,制成 5% 茶树油眼用凝胶剂,减少了其眼部黏膜刺激性,利于临床应用。为验证其对毛囊蠕形螨的杀灭作用是否高于甲硝唑滴眼液,特进行体外杀螨试验。

1 材料

1.1 主要试剂和仪器 茶树精油(江西吉安盛大香料有限公司,批号 20120627,医药级),卵磷脂(医药级)、胆固醇(BR 级)、维生素 E(医药级)、脱氧胆酸钠(医药级)、山梨酸酯-80(CP 级)(均为郑州博赛生物技术有限公司,批号分别为 20111206, 20120328, 20130426, 20120619, 20130411),无水乙醇(郑州化工二厂,批号 20130526,AR 级),卡波姆(北京海淀会友精细化工厂,批号 20130811,940),三乙醇胺(郑州华禹生物技术有限公司,批号 20130811,医药级),2% 甲硝唑滴眼液(河南省眼科研究所药物室配制,批号 20130913)。Nikon TS100-F 型倒置相差显微镜,Nikon BR 型图像采集软件系统(均为日本尼康公司)。恒温磁力搅拌器,恒温箱,超声波发生器(上海必能信超声有限公司)。

1.2 螨虫来源 以河南省立眼科医院眼科门诊睑

缘炎患者为取螨对象。采用眼睑睫毛毛囊拔取法获取毛囊蠕形螨。将镜检证实附着有蠕形螨的睫毛转移置 6 孔细胞板中,每孔收集 20 ~ 30 只活泼毛囊蠕形螨备用。

2 方法

2.1 茶树油凝胶制备^[8] 精密称取 10.0 g 茶树精油,加入 10 mL 无水乙醇,超声至混合均匀,得到乳化的类脂混悬液。用量筒量取 90 mL PBS 缓冲液(pH 6.8)置于 200 mL 烧杯中,将类脂混悬液滴入烧杯中,再用超声仪超声 20 min,得半透明的茶树油混悬液。取 3 g 卡波姆置于研钵中,加入 24 g 甘油,润湿研磨,溶胀 2 h 后,转移置 250 mL 量筒中。补充 PBS 缓冲液至总体积为 100 mL,制得卡波姆凝胶。将上述制备的半透明茶树油混悬液加入卡波姆凝胶中,加三乙醇胺调节 pH 6.8 ~ 7.2,搅拌均匀即得 200 mL 茶树油凝胶。凝胶中茶树精油质量分数为 5%。

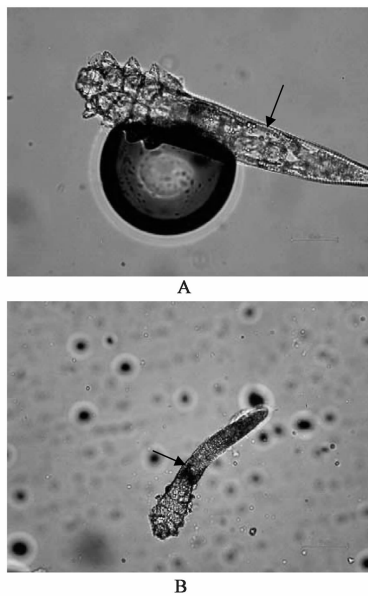
2.2 体外杀灭试验 所有体外药效试验在 6 孔细胞板中进行,每孔收集 20 ~ 30 只活泼毛囊蠕形螨,用微量移液器分别加入 5% 茶树油凝胶、2% 甲硝唑滴眼液、0.9% 生理盐水各 200 μ L,完全被睫毛并与虫体充分接触。将细胞板置于相对湿度为 70% ~ 80% 的湿盒中,放入 28 $^{\circ}$ C 恒温箱中。定时取出于(40 \times)倒置显微镜下观察蠕形螨活动情况。并记录其存活时间。滴加生理盐水孔为空白对照组。

2.3 虫体死亡判断标准 观察虫体螯肢或足爪持续 1 min 不动者,初定为死亡,间隔 30 min 继续观察,仍不动者,确定为死亡。

2.4 统计分析 应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,分别对相关数据进行 *H* 检验(Kruskal Wallis test),Wilcoxon 秩和检验及 Pearson χ^2 检验, $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

3 结果

3.1 茶树油凝胶对毛囊蠕形螨活动度及形态的影响 倒置显微镜下观察毛囊蠕形螨,加药前(图 A)虫体活动明显,4 对足运动协调,体表螺纹清晰(箭头所示)。加入茶树油凝胶后(图 1B),4 对足运动紊乱,身体左右摆动,虫体皱缩变形,体表螺纹消失



A. 加茶树油凝胶前; B. 加茶树油凝胶后

图1 加入茶树油凝胶前后毛囊蠕形螨虫体形态变化对比

表1 5%茶树油凝胶及2%甲硝唑滴眼液对毛囊蠕形螨的体外生存时间的比较

组别	观察虫数/条	生存时间/h										平均/h($\bar{x} \pm s$)
5% 茶树油凝胶	20	1.2	2.2	1.1	0.8	1.6	1.2	2.4	1.5	2.6	1.9	1.43 ± 0.62 ^{1,2)}
		0.4	1.6	1.5	1.7	0.9	2.0	0.8	1.8	0.5	0.9	
2% 甲硝唑滴眼液	20	27	25	26	32	25	30	19	20	40	36	27.65 ± 5.14
		31	29	28	26	24	25.5	32	30	26.5	21	
空白对照	6	20	18	22	25	28	27					23.33 ± 3.98

注:与2%甲硝唑滴眼液组相比¹⁾ $P < 0.01$;与空白对照组相比²⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

表2 毛囊蠕形螨在5%茶树油凝胶及2%甲硝唑滴眼液中24h死亡率的比较

组别	观察虫数/条	死亡虫数/条	24h死亡率/%
5% 茶树油凝胶	20	20	100.00 ^{1,2)}
2% 甲硝唑滴眼液	20	4	20.00
空白对照	6	3	50.00

4 讨论

毛囊蠕形螨主要寄生在患者眼睑睫毛的毛囊内。蠕形螨感染后,破坏毛囊、皮脂腺,阻塞皮脂分泌通道,是造成睑缘炎,干眼症等常见眼表疾病的重要原因。国外学者报道人群感染率可高达80%~90%。目前临床上对眼部毛囊蠕形螨感染的治疗,尚缺乏安全、高效的药物,传统杀螨剂,如临床常用的2%甲硝唑滴眼液,长期使用对眼表毒副作用较大,本次体外杀螨实验表明其对毛囊蠕形螨并无显著杀灭作用。

茶树油属于植物精油,取自于茶树的花、叶、根、

消失(箭头所示)。虫体周围有分泌物,虫体中央消化管开始收缩,随着茶树油凝胶作用时间的延长,虫体活动度减弱,最终死亡。

3.2 茶树油凝胶及2%甲硝唑对毛囊蠕形螨体外生存时间的比较 由表1可见,毛囊蠕形螨在2%甲硝唑溶液与空白对照组的存活时间差异无统计学意义。毛囊蠕形螨在5%茶树油凝胶与空白对照组的存活时间差异有统计学意义($P < 0.01$)。毛囊蠕形螨在5%茶树油凝胶与2%甲硝唑溶液组的存活时间差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3.3 毛囊蠕形螨在茶树油凝胶及2%甲硝唑中24h死亡率的比较 由表2可见,3组毛囊蠕形螨24h死亡率,5%茶树油凝胶与2%甲硝唑溶液组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。5%茶树油凝胶与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。2%甲硝唑溶液与空白对照组比较差异无统计学意义。

树皮、果实、种子、树脂等以蒸馏、压榨方式提炼出来的。天然高效,对人体细胞无杀伤作用^[9]。含有多多种杀菌成分,如:萜品-4-醇、 γ -萜品烯、 α -萜品烯、异萜品烯、 β -萜品醇等。结合于微生物细胞膜表面,造成穿孔,钾离子外流,微生物细胞结构破坏自溶。以一种膜表面破坏剂形式发挥作用。目前已广泛用于皮肤护理,口腔消炎等领域^[10-11]。又因其含有植物本身所特有的香味,故具有驱虫功能,长期使用可防止眼部蠕形螨的再感染与复发^[12-13]。

卡波姆(carbomer)又名聚羧乙烯,是一种多用途的高分子材料和药用辅料。在眼表疾病的治疗中应用广泛^[14-15],卡波姆940制成的凝胶,不仅可增强药物黏附性,避免其过快被人体吸收,减少对眼部的不良刺激。而且易于睑缘涂布,并能吸收组织渗液,利于分泌物的排泄。针对眼部皮肤菲薄的特点,笔者将茶树油中加入卡波姆制成5%凝胶剂,提高其生物相容性,能显著缓解对眼表组织的刺激作用,从而更好的应用于临床,提高对局部毛囊内螨虫的杀灭作用。

本次实验研究结果表明,5%茶树油凝胶对蠕形螨虫体有很强的杀灭作用。凝胶接触虫体后,虫体形态及活动度均发生了兴奋-痉挛-松弛-死亡的快速变化。与2%甲硝唑及空白组相比,生存时间明显减少。24 h内死亡率可达100%。作为一种安全高效的眼用抗螨制剂,将具有很好的开发前景。

[参考文献]

[1] Lee S H, Chun Y S, Kim J H, et al. The relationship between demodex and ocular discomfort [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(6) :2906.

[2] Kosik-Bogacka D I, Lanocha N, Lanocha A, et al. Role of *Demodex folliculorum* in the pathogenesis of blepharitis [J]. Acta Ophthalmol, 2012, 90(7) :e579.

[3] Yam J C, Tang B S, Chan T M, et al. Ocular demodicidosis as a risk factor of adult recurrent chalazion [J]. Eur J Ophthalmol, 2013, 16(6) :852.

[4] Kim H J, Chen F, Wu C, et al. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(3) :2849.

[5] Low W L, Martin C, Hill D J, et al. Antimicrobial efficacy of liposome-encapsulated silver ions and tea tree oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* [J]. Lett Appl Microbiol, 2013, 12(7) :368.

[6] Shao X, Cheng S, Wang H, et al. The possible mechanism of antifungal action of tea tree oil on *Botrytis cinerea* [J]. J Appl Microbiol, 2013, 114(6) :1642.

[7] Koo H, Kim T H, Kim K W, et al. Ocular surface discomfort and *Demodex*; effect of tea tree oil eyelid scrub in *Demodex blepharitis* [J]. J Korean Med Sci, 2012, 27(12) :1574.

[8] 徐云龙,王伟,钱秀珍,等. 茶树油纳米脂质体制备及处方设计与优化 [J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(5) :263.

[9] Susane Pereira T, Sant'anna J R, Leite Silva E, et al. *In vitro* genotoxicity of *Melaleuca alternifolia* essential oil in human lymphocytes [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 3(1) :3745.

[10] Blackwood B, Thompson G, McMullan R, et al. Tea tree oil (5%) body wash versus standard care (Johnson's Baby Softwash) to prevent colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in critically ill adults: a randomized controlled trial [J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(5) :1193.

[11] Thompson G, Blackwood B, McMullan R, et al. A randomized controlled trial of tea tree oil (5%) body wash versus standard body wash to prevent colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in critically ill adults: research protocol [J]. BMC Infect Dis, 2008, 28(8) :161.

[12] Elgendy E A, Ali S A, Zineldeen D H, et al. Effect of local application of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil gel on long pentraxin level used as an adjunctive treatment of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical study [J]. J Indian Soc Periodontol, 2013, 17(4) :444.

[13] Gao Y Y, Xu D L, Huang I J, et al. Treatment of ocular itching associated with ocular demodicosis by 5% tea tree oil ointment [J]. Cornea, 2012, 31(1) :14.

[14] Wang T J, Wang I J, Ho J D, et al. Comparison of the clinical effects of carbomer-based lipid-containing gel and hydroxypropyl-guar gel artificial tear formulations in patients with dry eye syndrome: a 4-week, prospective, open-label, randomized, parallel-group, noninferiority study [J]. Clin Ther, 2010, 32(1) :44.

[15] Wang I J, Lin I C, Hou Y C, et al. A comparison of the effect of carbomer-, cellulose- and mineral oil-based artificial tear formulations [J]. Eur J Ophthalmol, 2007, 17(2) :151.

[责任编辑 邹晓翠]