

## 双秦眼用凝胶对家兔眼部刺激性 及抗单疱病毒性角膜炎作用

梁丽娜<sup>1</sup>, 唐由之<sup>1\*</sup>, 周尚昆<sup>1</sup>, 李骄<sup>1</sup>, 江伟<sup>1</sup>, 刘淑芝<sup>2</sup>, 马群英<sup>1</sup>, 陆丽珠<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院眼科医院, 北京 100040; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 观察双秦眼用凝胶对实验性兔单纯疱疹病毒性角膜炎的治疗作用、眼部刺激性以及在眼部的滞留时间。方法: 采用单纯疱疹病毒(HSV-1)型 SM44 毒株接种划伤角膜的方法建立单疱病毒性角膜炎模型, 将造模成功的 50 只新西兰兔随机分为 5 组, 每组 10 只, 分别为 10%、20%、30% 的双秦眼用凝胶组, 阿昔洛韦眼液组, 凝胶基质组, 各组予以相应滴眼剂点眼治疗, 阿昔洛韦组每天 5 次, 其余 4 组每天 4 次。采用裂隙灯显微镜观察每组角膜上皮病变、角膜基质病变及动物死亡率; 对最佳作用浓度的双秦凝胶进行眼刺激性试验评价, 并采用荧光示踪法观察其在眼部的滞留时间。结果: 治疗 7 d 时, 阿昔洛韦滴眼液及 30% 双秦眼用凝胶对角膜上皮病变及角膜实质性病变的治疗作用均明显优于凝胶基质组, 10% 及 20% 双秦眼用凝胶组, 各组之间病变程度差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 30% 双秦眼用凝胶组与阿昔洛韦眼液组无统计学差异。治疗后 14 d, 30% 双秦眼用凝胶组的死亡率最低, 但与其他组相比, 差异无统计学意义。眼部刺激性试验结果显示 30% 双秦眼用凝胶点眼 1 h 后及点眼 7 d 后均无刺激性, 与生理盐水、阿昔洛韦眼液相比, 眼刺激分值无统计学差异; 30% 双秦眼用凝胶角膜囊滞留时间 ( $133 \pm 22.5$ ) min 和角膜滞留时间 ( $30 \pm 7.8$ ) min, 明显长于阿昔洛韦滴眼液及生理盐水组 ( $P < 0.05$ )。结论: 30% 双秦眼用凝胶对家兔单纯疱疹性角膜炎有较好的治疗作用, 其在眼部滞留时间较阿昔洛韦眼液明显延长, 且无眼部刺激性, 具有很好的开发前景。

**[关键词]** 双秦眼用凝胶; 单疱病毒性角膜炎; 眼刺激性; 眼部滞留时间

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0236-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013220236

## Eye Irritation and Anti-herpes Simplex Keratitis Effect of Shuangqin Ophthalmic Gel in Rabbit

LIANG Li-na<sup>1</sup>, TANG You-zhi<sup>1\*</sup>, ZHOU Shang-kun<sup>1</sup>, LI Jiao<sup>1</sup>, JIANG Wei<sup>1</sup>,  
LIU Shu-zhi<sup>2</sup>, MA Qun-ying<sup>1</sup>, LU Li-zhu<sup>1</sup>

(1. Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China;

2. Institute of Chinese Material Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe eye irritation, and therapeutic effect of Shuangqin ophthalmic gel on experimental rabbit herpes simplex keratitis (HSK), as well as evaluate the ocular residence time of Shuangqin ophthalmic gel. **Method:** The experimental HSK was induced by inoculation of HSV-1 (SM44 strain) on the scratched cornea. Fifty rabbits with HSK were divided into 5 groups: 10% Shuangqin group, 20% Shuangqin group, 30% Shuangqin group, acyclovir eye drop group, and gel substrate group. Acyclovir eye drop group was treated 5 times a day, while the other groups were treated 4 times a day. The severity of corneal epithelial lesion and stromal lesion were graded and the mortality rates of the different groups were recorded. Eye irritation of the Shuangqin ophthalmic gel with the best therapeutic effect was evaluated by irritation experiment, and the retention

**[收稿日期]** 20130417(023)

**[基金项目]** 国家科技部重大新药创制科技专项 (2009ZX09301-005-2-2)

**[第一作者]** 梁丽娜, 博士, 副研究员, 从事中西医结合眼科临床和科研, Tel: 010-68683451, E-mail: lianglina2001@hotmail.com

**[通讯作者]** \* 唐由之, 研究员, 从事中西医结合眼科临床和科研, Tel: 010-68683451, E-mail: tangyz2001@126.com

time of Shuangqin ophthalmic gel was measured by fluorescence tracer method. **Result:** On the 7th day after treatment, ACV eye drop and Shuangqin ophthalmic gel had a better therapeutic effect on both epithelial HSK and stromal HSK than other groups, the severity scores in the five groups were significantly different ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between 30% Shuangqin ophthalmic gel group and ACV group. On the 14th day after treatment, the mortality rate was lowest in the Shuangqin ophthalmic gel group, but there was no significant difference among the groups. The result of irritation test showed 30% Shuangqin ophthalmic gel both had no eye irritation after treatment for one hour and 7 days. The irritation scores in the Shuangqin ophthalmic gel group, ACV group and physiological saline group were not significantly different. The residence time of Shuangqin ophthalmic gel was  $(133 \pm 22.5)$  min and  $(54.13 \pm 8.48)$  min in the conjunctival sac and cornea respectively, there was significant difference compared with ACV group and physiological saline group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** 30% Shuangqin ophthalmic gel has a good therapeutic effect on experimental HSK, a prolonged residence time and no eye irritation, therefore it is a very good new drug candidate for HSK.

**[Key words]** Shuangqin ophthalmic gel; herpes simplex keratitis; eye irritation; ocular residence time

单疱病毒性角膜炎(HSK)是最常见的感染性角膜疾病,致盲率高,常反复发作。抗病毒药物治疗是目前首选的治疗方法,双秦滴眼液(病毒1号滴眼液)是唐由之研究员自1980年起研发的抗病毒滴眼液,曾做为院内制剂使用多年,临床观察及实验研究均显示出良好的抗单疱病毒性角膜炎作用<sup>[1-2]</sup>。但由于制剂工艺及剂型等原因,药物具有一定的刺激性,舒适性及稳定性较差,影响了该药的推广应用。本研究在保留原方基础上,将双秦滴眼液改制为双秦眼用凝胶,观察了其对兔单疱病毒性角膜炎的干预作用、刺激性以及眼部滞留时间。

## 1 材料

新西兰白兔(清洁级)50只,雌性,2~2.5 kg,购自北京市兴隆实验动物养殖厂,许可证号SCXK(京)2011-0006,裂隙灯显微镜检查双眼无眼疾。阿昔洛韦滴眼液(武汉五景药业有限公司,批号H42021090);10%,20%,30%双秦眼用凝胶及凝胶基质,中国中医科学院中药所制剂中心提供;荧光素钠注射液(广州白云山明兴制药有限公司,批号120602)。

## 2 方法

**2.1 HSK模型建立** 新西兰兔50只,饲养1周适应环境后,用裂隙灯检查排除眼部异常。采用氯胺酮注射液( $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),陆眠宁( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )静脉注射麻醉后,用角膜环钻(5 mm)钻除右眼角膜上皮,滴入HSV-1型SM44病毒原液 $10 \mu\text{L}$ ,病毒滴度 $\text{TCID}_{50}$ (50%组织细胞感染量)为 $10^{-7}$ ,病毒由中国预防医学科学院病毒病防治所提供。滴入病毒后闭眼按摩30 s。术前1 h氧氟沙星眼液点眼。

**2.2 分组和治疗** 根据病变程度均匀分成5组,每

组10只。接种后第1天开始治疗,对照组予凝胶基质点眼,1次/3 h,4次/d;阿昔洛韦眼液组,1次/2 h,5次/d;10%,20%,30%双秦眼用凝胶,1次/3 h,4次/d。

**2.3 眼部病变观察方法** 参照刘宏伟等的方法<sup>[3]</sup>。在接种病毒后2,3,5,7,9,11,14 d后观察角膜上皮病变、角膜实质性病变。

角膜上皮病变评分:用荧光素钠染色观察。0分:无染色;1分:染色面积 $< 25\%$ ;2分:面积为 $25\% \sim 50\%$ ;3分:面积为 $50\% \sim 75\%$ ;4分:面积 $> 75\%$ 。每度间以病变密度和深度又记为0.5分。

角膜实质病变评分:0分:角膜透明;1分:轻度水肿或轻度基质不透明,虹膜纹理清晰可见;2分:不透明和基质水肿限于角膜直径 $1/2$ 以内,虹膜纹理模糊可见;3分:角膜基质水肿和不透明超过角膜直径的 $1/2$ ,虹膜隐约可见;4分:角膜基质水肿和不透明严重,看不到虹膜。

**2.4 动物死亡率** 观察各组动物死亡情况,计算出死亡率。

## 2.5 眼部刺激实验

1次给药试验:家兔30只,眼科检查证明双眼符合要求后,分为3组,分别为双秦眼用凝胶30%组,阿昔洛韦眼液组,生理盐水组,右眼滴受试药0.1 mL,给药后1,3,24,72 h时做眼科裂隙灯检查(结膜、角膜、虹膜、分泌物)。

给药7 d试验:上批家兔饲养1周,经眼科检查双眼完全正常后,左眼滴入受试物4次/d,连续7 d。7 d后作眼科裂隙灯检查(结膜、角膜、虹膜、分泌物),参照“中药、天然药物刺激性溶血性研究的技术指导原则”进行评分<sup>[4]</sup>。

**2.6 眼部滞留时间** 参照宋成君的方法<sup>[5]</sup>。供试品的制备:分别称取适量荧光素钠加入到 30% 双秦眼用凝胶、阿昔洛韦滴眼液及生理盐水中,制备成 2% 荧光素钠-双秦眼用凝胶及阿昔洛韦滴眼液、生理盐水制剂。选用健康家兔 24 只,每组 8 只,右眼为受试眼。左眼为对照眼,将家兔固定头部,提起下眼睑,把结膜囊拉成环状,双秦凝胶组、阿昔洛韦组、生理盐水组分别滴入滴入含荧光素钠的双秦眼用凝胶、阿昔洛韦滴眼液、生理盐水 25  $\mu$ L。给药后,使家兔眼睛被动闭合 10 min,用裂隙灯观察,记录给药后角膜和结膜荧光素的荧光消退时间。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 10.0 软件包进行统计分析,多组之间均数比较采用方差分析,多组之间两两比较采用  $q$  检验;死亡率比较采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 眼部病变观察** 接种后 2 天家兔角膜均出现点状、棒状病灶,随着病程延长,各组病变出现差异,其中以凝胶基质组、10% 双秦凝胶组、及 20% 双秦凝胶组病变较重,接种后第 5~6 天出现大片地图状溃疡,部分家兔逐渐出现明显的角膜基质水肿和浸润。阿昔洛韦滴眼液组和 30% 双秦凝胶组家兔接种眼病变较轻,以点状、树枝状病变为主,基质病变轻微,治疗后 7 d 与凝胶基质组角膜上皮及实质病变程度相比,差异显著( $P < 0.05$ )。30% 双秦凝胶与阿昔洛韦滴眼液两组之间角膜上皮病变程度相比,差异无统计学意义。治疗后 14 d,阿昔洛韦滴眼液组及 30% 双秦眼用凝胶组角膜病变基本痊愈,而其他各组的角膜病变仍比较严重,但因各组家兔因合并病毒性角膜炎死亡较多,每组动物只数很少,无法做统计学分析。见表 1。

表 1 双秦眼用凝胶治疗 7 d 对角膜病变评分的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ ) 分

组别	角膜上皮病变	角膜实质病变
凝胶基质	3.25 $\pm$ 0.71	2.88
阿昔洛韦滴眼液	2.14 $\pm$ 0.19 <sup>1)</sup>	0.143 <sup>1)</sup>
30% 双秦眼用凝胶	2.22 $\pm$ 0.44 <sup>1)</sup>	1.67 <sup>1)</sup>
20% 双秦眼用凝胶	3.11 $\pm$ 0.78	3.11
10% 双秦眼用凝胶	3.11 $\pm$ 0.93	2.67

注:与凝胶基质组相比<sup>1)</sup> $P < 0.05$ (表 2 同)。

**3.2 死亡率** 角膜接种病毒后,病毒可以沿着神经轴突侵入大脑,引起病毒性脑炎而导致动物死亡。本次实验在治疗 7 d 时,凝胶基质组死亡 2 只,阿昔

洛韦组死亡 3 只,双秦眼用凝胶各组均死亡 1 只。随着病程的延长,各组患脑膜炎死亡家兔增加,治疗 14 d 后凝胶基质组、10% 及 20% 双秦眼用凝胶组均死亡 8 只家兔,阿昔洛韦滴眼液组死亡 6 只,30% 双秦眼用凝胶组死亡 5 只,在所有组别中死亡率最低,但统计学分析各组死亡率差异无统计学意义。见表 2。

表 2 双秦眼用凝胶治疗 7,14 d 死亡率 %

组别	治疗 7 d	治疗 14 d
凝胶基质	20	80
阿昔洛韦滴眼液	30	60
30% 双秦眼用凝胶	10	50
20% 双秦眼用凝胶	10	80
10% 双秦眼用凝胶	10	80

**3.3 眼部刺激性** 根据药效学实验结果显示,30% 双秦眼用凝胶作用最佳,对 30% 双秦眼用凝胶进行刺激性试验。双秦眼用凝胶点眼后,兔眼结膜轻度充血,个别有少量分泌物,无水肿,角膜透明,虹膜纹理清晰,瞳孔对光反应灵敏,刺激性评价结果 3 组均无刺激性。给药 1 次及给药 7 d 的刺激性评分与生理盐水及阿昔洛韦眼液组,无统计学差异。

**3.4 药物眼部滞留时间** 双秦眼用凝胶在角膜及结膜囊的滞留时间均明显长于阿昔洛韦滴眼液及生理盐水组( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 双秦眼用凝胶眼部滞留时间( $\bar{x} \pm s, n = 8$ ) min

组别	角膜滞留时间	结膜囊滞留时间
30% 双秦眼用凝胶	54.13 $\pm$ 8.48 <sup>1)</sup>	142.37 $\pm$ 7.35 <sup>1)</sup>
阿昔洛韦滴眼液	19.75 $\pm$ 1.58	46.25 $\pm$ 2.43
生理盐水	18.13 $\pm$ 4.12	31.38 $\pm$ 5.34

注:与阿昔洛韦组及生理盐水组相比<sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。

### 4 讨论

单纯疱疹性角膜炎(HSK)多由单纯疱疹病毒 I 型引起,是首要的致盲性角膜疾病<sup>[6]</sup>。目前 HSK 的治疗仍以核苷类抗病毒药物为主,但长期反复使用后,容易产生耐药现象和上皮毒性。已有大量文献报道从临床标本中分离出耐药株,并可用药物诱导的方法培养出耐药株<sup>[7]</sup>。因此寻找新的抗病毒药一直该领域的研究热点。

病毒 1 号滴眼液(双秦滴眼液)处方来源于《秘传眼科龙木论》中之秦皮汤,由秦皮、秦艽、细辛、防风、甘草组成。唐由之研究员取其药味组方,从 1980 年起对该复方进行了实验研究,经过细胞培养

与动物实验证实该复方滴眼液具有与碘苷(IDu)相同的抗1型单纯疱疹病毒(HSV-1)作用。体外细胞培养实验又发现本制剂与0.1%阿昔洛韦滴眼液有相似的抗HSV-1的作用;动物实验结果显示病毒1号滴眼液对实验性家兔单纯疱疹性角膜炎有较好的防治作用<sup>[1]</sup>。临床观察亦发现病毒1号滴眼液治疗组与阿昔洛韦滴眼液对照组近期疗效无显著差别,治愈后随访2年,病毒1号滴眼液组复发率(11.1%)明显低于阿昔洛韦滴眼液组(26.32%)<sup>[2]</sup>。上述实验结果证明病毒1号具有良好的抗单疱病毒性角膜炎作用,而且与阿昔洛韦滴眼液相比具有抗复发的优势,但因其刺激性强、舒适性差,部分患者不能坚持治疗,影响了该药的临床推广和进一步开发。

用亲水性高分子聚合物(纤维素类、透明质酸及壳聚糖类等)作为基质制成的眼用凝胶是一种新型眼科局部滴眼剂型,透明性好,用后不影响视线;能延长药物在角膜的滞留时间,增加药物的吸收,可维持稳定的释药速度,此外还可以润滑眼表,保持泪膜稳定性,促进损伤角膜上皮的修复<sup>[8-9]</sup>。本次实验发现,双秦眼用凝胶在角膜和结膜囊的滞留时间较阿昔洛韦滴眼液眼液明显延长;根据“中药、天然药物刺激性溶血性研究的技术指导原则”评价显示无刺激性;药效观察发现,双秦眼用凝胶对单疱病毒性角膜炎有一定的治疗作用,其中以30%最佳,与阳性对照药阿昔洛韦滴眼液的疗效相当,初步显示双秦眼用凝胶是一种疗效好、副作用小的抗单疱病毒性角膜炎制剂。

本次实验模型动物合并脑膜炎的比较多,一方面可能和接种的病毒滴度过高有关,另一方面笔者以往的实验发现家兔本身容易合并病毒性脑膜炎。虽然家兔的角膜较大,易于操作,便于病变的观察,但由于较高的死亡率以及角膜炎治愈后容易产生自

发性复发的特点,影响了药物对角膜炎后期疗效的观察以及抗复发性角膜炎的研究<sup>[10]</sup>,因此,在今后的研究中拟以小鼠为模型动物,进一步研究双秦眼用凝胶抗单疱病毒性角膜炎的作用及作用机制。

#### [参考文献]

- [1] 王克,白桂萍,高培质. 病毒1号滴眼液对实验性单疱病毒性角膜炎预防作用的观察[J]. 中国中医眼科杂志,1992,2(3):159.
- [2] 高培质,王克,李和平,等. 病毒1号滴眼液治疗单纯疱疹性角膜炎研究[J]. 中国中医眼科杂志,1992,2(3):142.
- [3] 刘宏伟,王文,周毅,等. 环香酮滴眼液治疗家兔单纯疱疹病毒性角膜炎[J]. 中国中医眼科杂志,2009,19(5):255.
- [4] 国家食品药品监督管理局. 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[S]. 2005-03.
- [5] 宋成君,王颖,王春艳,等. 黄芩温度敏感凝胶剂的研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(6):628.
- [6] Liesegang T J. Epidemiology of ocular herpes simplex: natural history in Rochester, Minn, 1950 through 1982 [J]. Arch Ophthalmol,1989,107(8):1160.
- [7] 郑波,王千秋. 单纯疱疹病毒耐药的流行趋势及其耐药机制的研究进展[J]. 国际皮肤性病学期刊,2006,32(5):318.
- [8] 王志刚. 眼用凝胶剂研究进展[J]. 中国执业药师,2012,9(10):33.
- [9] 徐建泓,孙爱华. 莪树油滴眼液体内抗菌和抗病毒作用的药理学研究[J]. 微生物学杂志,2008,28(2):77.
- [10] 夏立坤,高殿文,张劲松. 复发性单疱病毒性角膜炎实验模型的研究[J]. 中国实用眼科杂志,2001,19(9):706.

[责任编辑 李玉洁]