

## 熊胆眼药水刺激性因素筛查

陈洪林\*

(新余市妇幼保健院,江西 新余 338000)

**[摘要]** 中药滴眼剂的安全性评价一直是中药滴眼剂的质量生命线上最主要的一环。药厂和医院一直想找到一种方法可以保证制剂的质量和安全性。该研究建立一种基于细胞毒性检测用以筛查评价中药滴眼剂刺激性的体外快速评测方法,并运用该方法解决熊胆滴眼液刺激性较明显的难题。

**[关键词]** 熊胆眼药水;刺激性;细胞毒性检测

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0248-03

熊胆眼药水由熊胆单味中药研制而成,具有清热解毒,豁痰明目的功效,主要用于治疗急、慢性卡他性结膜炎,但该药具有较强刺激性,影响了其临床应用<sup>[1]</sup>。本文拟依托南昌大学附属各家医院的眼科

门诊部,收集整理 4 种临床上常用的熊胆滴眼液临床用药信息,将这 4 种滴眼液按照刺激性强弱进行分级。并采用新建立的快速体外刺激性评价方法筛查该眼药水刺激性的原因,并解决该难题,为该评价方法在中药滴眼剂刺激性评价领域作一研究。

### 1 材料

**1.1 动物** 白种家兔 70 只,由南昌大学动物实验中心提供。

**[收稿日期]** 2010-11-20

**[通讯作者]** \* 陈洪林,主治医师,从事眼科临床, Tel: 13576473049, E-mail: justy11116@126.com

规模试验。而如何避免高效药物的毒副作用,提高有效性以及寻找合理的作用途径都是亟待解决的问题。国外临床应用观察报道,曲伏前列素滴眼液(苏为坦)能强力而持久地降低眼内压,降眼压作用在用药 2 h 后开始出现,在 12 h 达到最大,至少持续 24 h,滴用 1 次,眼压下降大于 35%,其安全性优于其他抗青光眼药物,为目前最有效的局部用药<sup>[7]</sup>。

原发开角型青光眼在中医学隶属于“青风内障”之范畴,而后历代医家经过不断总结与积累,将其病因病机归纳为由于情志过伤、痰湿泛目、痰火郁结、肝肾虚衰、阴虚血少等导致神水瘀阻所致。病位主要在肝经,涉及于脾肾,病情可虚可实,常为虚实夹杂。治疗常以疏肝理气,凉肝熄风,祛痰化火,补益肝肾为法<sup>[8]</sup>。因此本研究中通过辨证分型,因人制宜给予不同的中药进行治疗,配以西药综合治疗,可增强视野平均光敏度,减少视野缺损及增加视神经电生理活动,总有效率达到 92.3%,效果良好。

### [参考文献]

[1] 邱敬华,刘旭阳,武正清. 青光眼药物治疗的回顾和展望[J]. 国际眼科杂志, 2007, 7(3): 754.

- [2] 汪宁,彭智境,范宝剑,等. 我国原发性开角型青光眼危险因素病例对照研究[J]. 中华流行病学杂志, 2002, 23(4): 22.
- [3] 姚小萍,刘军,张敬先. 中西医结合治疗原发性开角型青光眼的临床研究[J]. 中国中医眼科杂志, 2003, 13(2): 83.
- [4] 赵家良. 重视原发性青光眼的早期诊断和干预[J]. 中华眼科杂志, 2007, 43: 769.
- [5] 葛坚,孙兴怀,王宁利,等. 现代青光眼研究进展[M]. 北京:科学技术出版社, 2000: 217.
- [6] 施殿雄. 实用眼科诊断[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2005: 562.
- [7] Glodbery L, Cunha-Vaz J, Jakobsen J E, et al. Comparison of topical travoprost eye drops given once daily and timolol 0.5% given twice daily in patient with open-angle glaucoma or ocular hypertension [J]. Glaucoma, 2001, 10: 414.
- [8] 曹水清,李翔,张雪梅,等. 原发性开角型青光眼中西医研究现状[J]. 北京中医药大学学报·中医临床版, 2008, 15(6): 32.

[责任编辑 何伟]

**1.2 药物与试剂** 成都地奥集团熊胆眼药水(批号 Z20025417)、湖北鑫烨医药有限公司熊胆眼药水(批号 Z20025416)、河北医科大学制药厂熊胆眼药水(批号 Z20025416)、瑞丽民族制药厂熊胆眼药水(批号 Z20025416)、胎牛血清(济南翔宇生物试剂有限公司,批号 16000044)。

## 2 方法和结果

对家兔采用直接接触法和混合培养法刺激角膜上皮细胞,评价不同处方配比对兔角膜上皮细胞存活率的影响,将实验结果分别与临床刺激性进行相关性分析,优选相关性较优的细胞毒性检测方法作为熊胆滴眼液刺激性的体外评价方法。

**2.1 家兔角膜上皮细胞的培养** 将家兔断头放血处死后,于无菌环境下摘取眼球,放置于  $\times 10^4 \text{ u}\cdot\text{L}^{-1}$  青霉素溶液漂洗 2 次,取家兔角膜缘部上皮组织:定位于角膜缘灰白交界后 1 mm 处进行穿刺,留取包括 1 mm 巩膜缘的眼前段组织,并在解剖镜下剔除附属组织,将所得的角膜组织分层撕取角膜内皮及后弹力层,再沿透明角膜环切取下 2 ~ 2.5 mm 宽的角膜缘组织,剪成 1 mm  $\times$  1 mm  $\times$  1 mm 大小并将组织块平铺于培养瓶中,放置于恒温培养箱中进行培养,3 d 首次换液,第 2 次开始隔日换液。将原代培养至 80% 融合后经 0.25% 胰酶消化传代,再培养 3 d 首次换液,第 2 次开始隔日换液,直至细胞融合。传代细胞(2 ~ 4 代)后可备实验用。将备用细胞调整密度为  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 培养板中,培养 5 d 后细胞达到铺平状态。

**2.1.1 直接接触法刺激角膜上皮细胞** 将培养液吸出后加至不同滴眼液溶液 100  $\mu\text{L}$  作用 20 min,吸出滴眼液,经过 PBS 冲洗 2 次后加入含 10% 胎牛血清的培养基 180  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$  MTT( $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),孵育 4 h 后吸出培养基,加入至 150  $\mu\text{L}$  DMSO,酶标仪 570 nm 测定其吸光度。

**2.1.2 混合培养法刺激角膜上皮细胞** 将培养液吸出后加至含 40  $\mu\text{L}$  滴眼液样品的培养基继续培养 24 h,再吸出含样品溶液的培养基,其他步骤同直接接触法。

**2.2 考察处方** 本研究采用单因素分析的方法进行筛选考察,每个样品即为处方缺失某 1 药物而制得的样品。筛查每种药物对刺激性的影响。熊胆眼药水处方:熊胆粉 5.0 g,硼酸 12.0 g,硼砂 0.6 g,氯化钠 2.2 g,羟苯乙酯 0.8 g。见表 1。

表 1 各观察样品组成

序号	组成成分				描述
1	熊胆粉	硼酸	硼砂	氯化钠	缺羟苯乙酯
2	熊胆粉	硼酸	硼砂	羟苯乙酯	缺氯化钠
3	熊胆粉			氯化钠 羟苯乙酯	缺硼酸硼砂
4	熊胆粉	硼酸		氯化钠 羟苯乙酯	缺硼砂
5	熊胆粉		硼砂	氯化钠 羟苯乙酯	缺硼酸
6		硼酸	硼砂	氯化钠 羟苯乙酯	缺熊胆粉
7	熊胆粉				熊胆原液

当样品中同时含有熊胆粉与羟苯乙酯,细胞毒性明显增加,角膜上皮细胞存活率低于 70%,而当样品中无熊胆粉或羟苯乙酯,角膜上皮细胞的存活率与阴性对照组之间没有统计学意义,提示熊胆原液与羟苯乙酯共存增加了熊胆眼药水的刺激性。结果如图 1 所示。

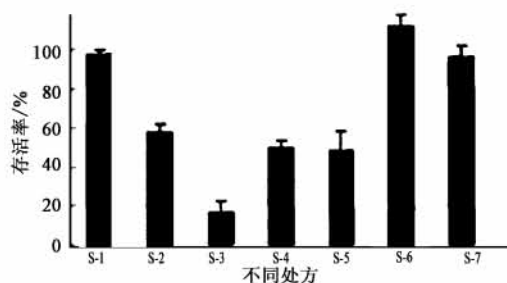


图 1 不同处方配比对兔角膜上皮细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 70$ )

**2.3 考察制备工艺** 按照滴眼液制备工艺,对熊胆的提取时间、水提醇沉工艺影响各因素、提取方式和合并煎煮时间 4 个环节进行刺激性考察。

**2.3.1** 将熊胆粉分别煎煮 10, 20, 30 min, 得到相应的熊胆粉原液, 分别以熊胆粉原液和熊胆粉原液加入其他处方配制成分方液样品, 评价各样品刺激性的大小。通过化妆品进行评价, 发现煎煮时间对角膜上皮细胞存活率的影响差异没有统计学意义, 并且处方组角膜上皮细胞存活率均低于熊胆原液组。如图 2 所示。

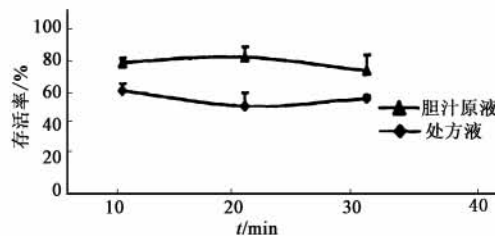


图 2 不同煎煮时间对角膜上皮细胞存活率的影响

**2.3.2** 取熊胆粉, 进行水提法、水提醇沉法、乙醇提

取法、水提离心法 4 种方法得到样品液,然后用微孔滤膜滤过。得出水提醇沉法和乙醇提取法制得的熊胆原液其细胞毒性都较小,明显优于水提离心和直接水提法。如图 3 所示。

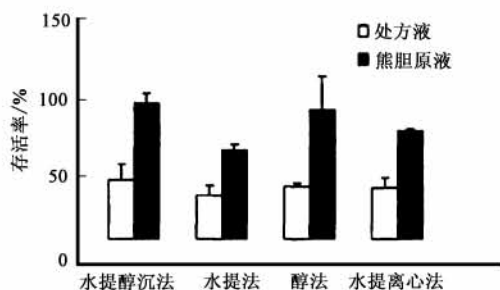


图 3 不同提取方法制备滴眼液与熊胆原液对角膜上皮细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 70$ )

2.3.3 将熊胆原液与其他药品的混合液分别不煎煮、煎煮 10, 20, 30, 60 min, 微孔滤膜滤过, 分别得到相应的处方液样品。通过实验可知将熊胆原液与其他药品的混合液煎煮 0 ~ 30 min 对角膜上皮细胞毒性的影响没有差异, 当混合煎煮达 60 min 时, 样品对兔角膜上皮细胞毒性明显减小 ( $P < 0.01$ )。如图 4 所示。

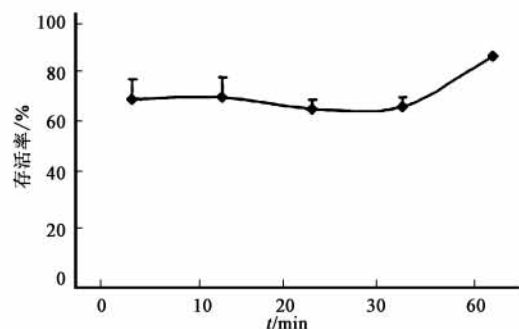


图 4 不同煎煮时间的药液对角膜上皮细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 70$ )

### 3 改善熊胆滴眼液刺激性的建议

3.1 更换防腐剂 对方剂的筛选研究发现,造成熊胆眼药水刺激性的主要原因是防腐剂与熊胆提取液的共存,为了降低其刺激性,改用山梨酸进行实验研究,山梨酸在用量为 0.15% ~ 0.25%,通过实验得出相对于羟苯乙酯,山梨酸进一步增加了熊胆眼药水的细胞毒性,对刺激性没有任何缓解作用 ( $P < 0.01$ )。

3.2 降低防腐剂用量 羟苯乙酯作为防腐剂用量的浓度范围为 0.05% ~ 0.10%,该处方选用的浓度为 0.08%,拟降低防腐剂用量研究其对熊胆眼药水刺激性的影响。将处方中羟苯乙酯用量调整为

0.29, 0.49, 0.69, 0.89, 1.09, 1.290  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通过比较显示降低防腐剂的用量能减轻其细胞毒性,具备一定缓解刺激性的作用。

3.3 添加羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 结合实际情况,本研究在熊胆眼药水的制备过程中添加不同比例 CMC-Na (0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.20%, 0.25%) 分别进行考察。结果显示,当 CMC-Na 的含量达到 0.20% 时,细胞存活率显著增加,刺激性减小。CMC-Na 含量达到 0.30% 时,刺激性将进一步降低,但该浓度滴眼液黏度过大不利于临床应用。含 CMC-Na 0.20% ~ 0.25% 的熊胆滴眼液其刺激性明显降低 ( $P < 0.05$ )。

3.4 添加透明质酸钠 透明质酸钠可有效降低滴眼剂中防腐剂带来的毒性作用,防腐剂多是带正电荷的,它与聚阴离子的透明质酸钠发生离子吸引从而中和了防腐剂对结膜和角膜上皮的毒性作用。防腐剂与聚阴离子透明质酸钠之间的结合,可以使防腐剂与细胞膜的结合这一可逆过程的平衡向解离的方向移动,从而减轻细胞的毒性作用<sup>[2-3]</sup>。防腐剂分子进入透明质酸钠形成的大分子网状结构区内并且分散在其中,阻隔了防腐剂对角膜和结膜上皮的损害。在熊胆眼药水的制备过程中添加不同比例 (0.02%, 0.04%, 0.08%, 0.10%, 0.20%, 0.30%) 透明质酸钠分别进行考察。结果显示,透明质酸钠含量在 0.02% ~ 0.30% 对熊胆眼药水的刺激性没有明显改善作用,相反可能会增加滴眼液的刺激性。

### 4 结论

本研究显示,水提醇沉法和乙醇提取法制得的熊胆原液其细胞毒性都较小,熊胆原液与其他药品的混合液煎煮 60 min 时,样品对兔角膜上皮细胞毒性明显减小,降低防腐剂的用量能减轻其细胞毒性并具备一定缓解刺激性的作用,含 CMC-Na 0.20% ~ 0.25% 的熊胆滴眼液其刺激性明显降低,不建议在眼药水中增加透明质酸。

### [参考文献]

[1] 鄢重成. 中药治疗单纯疱疹病毒性角膜炎 31 例临床观察[J]. 中医药导报, 2005, 11(8): 35.  
[2] 刘天强, 肖丹, 何健, 等. SS 熊胆眼药水刺激性研究[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(6): 22.  
[3] 代龙. 熊胆眼用即型凝胶的制备及评价[J]. 中成药, 2009, 31(8): 101.

[责任编辑 何伟]