

热毒清滴眼液治疗单纯疱疹性角膜炎的实验研究

钟良玉,陈红梅,陈静宜,徐玮(杭州市中医院,浙江 杭州 310007)

摘要:目的 评估中药热毒清滴眼液对兔实验性单纯疱疹性角膜炎(herpes simplex keratitis, HSK)作用和超声雾化强化给药的疗效及急性毒性与眼的刺激反应。方法 26只新西兰白兔(52只眼)角膜划痕接种I型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus-1, HSV-1)。HSK模型随机分为热毒清雾化组:热毒清滴眼液通过超声雾化治疗;热毒清滴眼组:热毒清滴眼液滴眼治疗;无环鸟苷组:无环鸟苷滴眼液滴眼治疗;对照组:生理盐水滴眼治疗。观察18d时的疗效,对兔眼的刺激情况及对小鼠的不良反应。结果 三个治疗组有效率均显著高于对照组($P < 0.05$);热毒清雾化组有效率高于热毒清滴眼组和无环鸟苷组;热毒清滴眼液滴眼与无环鸟苷滴眼液滴眼疗效相同。对兔及小鼠都未发生全身和局部不良反应。结论 这个结果有力提示,中药热毒清滴眼液对HSK有明显疗效,超声雾化给药能强化药效。

关键词:实验性单纯疱疹性角膜炎;热毒清滴眼液

基金项目:浙江省中医药科研基金(98039)

Experimental study on herpes simplex keratitis treated with Reduqing eye drop

ZHONG Liang-yu, CHEN Hong-mei, CHEN Jing-yi, XU Wei (Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the effect of herbal eye drop of Reduqing (clearing toxic heat) and potentialization of ultrasonic nebulous administration of Reduqing on experimental herpes simplex keratitis (HSK) in rabbits, the acute toxicity test and the irritating eye reaction. **METHOD** The 26 normal New Zealand White rabbits (52 eyes) were inoculated bilaterally with strain herpes simplex virus-1 (HSV-1) by corneal scarification. The models of the experimental HSK were randomly divided into four groups. The Reduqing nebulous group were treated with Reduqing eye drop by ultrasonic nebulization, the Reduqing eye group with Reduqing eye drop, the aciclovir eye drop with Aciclovir eye drop, and the control group were treated with normal saline eye drop. The effective rate of treatment within 18 days was recorded and the results were compared among the four groups. The irritating eye reaction in rabbits and the acute toxicity test in mice were observed. **RESULTS** The effective rates of three treatment groups were higher than that of the control group ($P < 0.05$). The effective rate of Reduqing nebulous group was higher than that of the Reduqing eye drop group, while no significant difference was observed in the Reduqing eye drop group and aciclovir eye drop group. No general and local side effects occurred both in rabbits and mice. **CONCLUSION** The Reduqing eye drop has marked effect on experimental HSK in rabbits. The ultrasonic nebulous administration can improve the drug effect.

KEY WORDS: experimental herpes simplex keratitis, Reduqing eye drop

单纯疱疹性角膜炎(herpes simplex keratitis, HSK)是公认的首位炎症性致盲性眼病。随着激素、器官移植、免疫抑制剂应用、爱滋病增多, HSK的发病率也在攀升。对 HSK 的治疗, 无论是化学药物还是手术都有较高的复发率, 甚是棘手。我们将热毒清滴眼液应用于临床已 8 年, 对 HSK 有确切的疗效。本研究旨在客观评价热毒清滴眼液雾化和滴眼对兔实验性 HSK 的治疗作用及热毒清滴眼液的急性毒性和对眼的刺激反应。

1 热毒清滴眼液雾化治疗兔实验性 HSK

1.1 材料

1.1.1 药物:热毒清滴眼液, 棕褐色液体, 由杭州市中医院中药制剂室提供, 批号: 990422, 规格: 10 mL/支, 每 1 mL 相当生药 1.74g; 无环鸟苷滴眼液, 武汉武警制药厂生产, 批号: 9906131; 戊巴比妥钠, 上海化学试剂采购供应站试剂厂进口分装, 批号: 800603; 荧光素钠, 北京化工厂生产, 批号: 781030。

1.1.2 毒株: HSV-1 株, 100 TCD₅₀/0.1 mL, 来源于中国预防医学科学院病毒研究所。

1.1.3 动物:家兔, 新西兰种, 雌雄兼用, 体重 2.0 ~ 3.0 kg, 由浙江省实验动物中心提供, 单笼饲养, 动物饲养合格证: 浙实验动物准字 2001001 号。

1.1.4 仪器:402 超声雾化仪, 上海合力医疗器械厂产品。超声频率(1.4 ± 0.1) MHz。

1.2 方法和结果

1.2.1 造模:选用健康新西兰家兔 26 只, 雌雄兼用, 参考文献[1]方法, 以 3% 戊巴比妥钠生理盐水溶液耳缘静脉注射 30 mL/kg 麻醉, 用 6 mm 角膜环钻在角膜上压痕并在其

压痕内作井字划痕(深度以角巩缘微有渗血为度), 滴加 0.1 mL HSV-1 病毒培养液(相当于 100 CD₅₀), 闭眼按摩 1 mm, 每隔 2 h 接种 1 次, 共 3 次; 2 d 后以 2% 荧光素钠生理盐水溶液染色, 放大镜下观察角膜病变(角膜上皮点状、树枝状、地图状着色及基质混浊)范围。

1.2.2 判断病变程度:按文献[2~3]标准, 稍加改动, 作病变程度判断标准: 0 级: (-) 无着色和混浊; 1 级: (+) 着色和混浊的范围为原病变(压痕)范围 1/4 以内; 2 级: (++) 着色和混浊的范围为原病变(压痕)范围 1/4 ~ 1/2; 3 级: (+++) 着色和混浊的范围为原病变(压痕)范围 1/2 ~ 3/4; 4 级: (+++++) 着色和混浊的范围为原病变(压痕)范围 3/4 以上或无变化。

1.2.3 分组:按病变的深浅、形态、严重程度搭配分为 4 组, 每组 6 ~ 8 只(12 ~ 16 只眼), 分别给予如下处理: 第一组用生理盐水滴眼(对照组); 第二组用无环鸟苷滴眼液滴眼(无环鸟苷组); 第三组用热毒清滴眼液滴眼(热毒清滴眼组); 第四组用热毒清滴眼液超声雾化给药(热毒清雾化组)。除第四组每天分上下午共 2 次, 每次 0.5 h 雾化给药外, 其余 3 组均每天 5 次(间隔 2 h)滴眼, 每次 1 滴, 连续 18 d, 每 3 天用 2% 荧光素钠生理盐水溶液染色, 放大镜下观察记录病情变化。结果见表 1 ~ 7。

1.3 Ridit 检验

从表 1 可见, 各治疗组未用药前, 角膜病变经 Ridit 检验法检验与对照组相比无显著性差异($P > 0.05$)。说明四组角膜病变具有可比性。

表 1 未用药前角膜病变

Tab 1 Pathological changes in cornea before medication of

Reducing

组别	眼数	角膜病变程度						R	P
		-	+	++	+++	++++	+++++		
对照组	16	0	2	5	4	5			
无环鸟苷组	12	0	1	4	5	2		0.47	<0.05 ¹⁾
热毒清滴眼组	12	0	1	3	5	3		0.52	<0.05 ²⁾
热毒清雾化组	12	0	2	4	4	2		0.43	<0.05 ³⁾

$\chi^2 = 0.744$; $P > 0.05$; ¹⁾: 无环鸟苷组与对照组比较; ²⁾: 热毒清滴眼组与对照组比较; ³⁾: 热毒清雾化组与对照组比较 (下同)

Note: $\chi^2 = 0.744$; $P > 0.05$; ¹⁾²⁾³⁾: Compared with the control group

表 2 用药 3d 角膜病变

Tab 2 Pathological change in cornea after 3 days of medication of Reducing

组别	眼数	角膜病变程度						R	P
		-	+	++	+++	++++	+++++		
对照组	16	0	2	2	10	2			
无环鸟苷组	12	1	1	6	4	0		0.2865	<0.05 ¹⁾
热毒清滴眼组	12	1	2	6	3	0		0.2448	<0.05 ²⁾
热毒清雾化组	12	1	5	5	1	0		0.1510	<0.05 ³⁾

$\chi^2 = 86.55$; $P < 0.01$

表 3 用药 6d 角膜病变

Tab 3 Pathological change in cornea after 6 days of medication of Reducing

组别	眼数	角膜病变程度						R	P
		-	+	++	+++	++++	+++++		
对照组	16	0	2	7	6	1			
无环鸟苷组	12	2	5	5	0	0		0.1693	<0.05 ¹⁾
热毒清滴眼组	12	1	6	4	1	0		0.2083	<0.05 ²⁾
热毒清雾化组	12	3	5	4	0	0		0.1406	<0.05 ³⁾

$\chi^2 = 14.82$; $P < 0.01$

表 4 用药 9d 后角膜病变

Tab 4 Pathological change in cornea after 9 days of medication of Reducing

组别	眼数	角膜病变程度						R	P
		-	+	++	+++	++++	+++++		
对照组	16	2	2	9	3	0			
无环鸟苷组	12	4	5	3	0	0		0.2318	<0.05 ¹⁾
热毒清滴眼组	12	5	5	2	0	0		0.1927	<0.05 ²⁾
热毒清雾化组	12	8	4	0	0	0		0.1042	<0.05 ³⁾

$\chi^2 = 16.52$; $P < 0.01$

表 5 用药 12d 后角膜病变

Tab 5 Pathological change in cornea after 12 days of medication of Reducing

组别	眼数	角膜病变程度						R	P
		-	+	++	+++	++++	+++++		
对照组	16	2	7	6	1	0			
无环鸟苷组	12	8	3	1	0	0		0.1901	<0.05 ¹⁾
热毒清滴眼组	12	9	3	0	0	0		0.1328	<0.05 ²⁾
热毒清雾化组	12	11	1	0	0	0		0.0859	<0.05 ³⁾

$\chi^2 = 18.67$; $P < 0.01$

表 6 用药 15d 后角膜病变

Tab 6 Pathological change in cornea after 15 days of medication of Reducing

组别	眼数	角膜病变程度						R	P
		-	+	++	+++	++++	+++++		
对照组	16	5	9	1	1	0			
无环鸟苷组	12	9	3	0	0	0		0.3750	>0.05 ¹⁾
热毒清滴眼组	12	11	1	0	0	0		0.3333	<0.05 ²⁾
热毒清雾化组	12	11	1	0	0	0		0.3333	<0.05 ³⁾

表 7 用药 18d 后角膜病变

Tab 7 Pathological change in cornea after 18 days of medication of Reducing

组别	眼数	角膜病变程度						R	P
		-	+	++	+++	++++	+++++		
对照组	16	10	6	0	0	0			
无环鸟苷组	12	11	1	0	0	0		0.3542	>0.05 ¹⁾
热毒清滴眼组	12	12	0	0	0	0		0.3125	<0.05 ²⁾
热毒清雾化组	12	11	1	0	0	0		0.3542	>0.05 ³⁾

表 2 ~ 表 5 组间分析, 差别有统计学意义。从结果可以看出, 热毒清滴眼液滴眼或雾化给药从第 3 天起至第 12 天, 角膜病变迅速好转, 与对照组相比, 均有显著性差异 ($P < 0.05$)。无环鸟苷组与热毒清滴眼组疗效相等, 这两组间无显著性差异 ($P > 0.05$); 热毒清雾化给药组 R 值较热毒清滴眼组明显要小, R 值越小疗效越佳, 但两者之间统计学上计算得出数据恰在无显著性差异的临界数据之上, 所以在统计学上 P 值仍 > 0.05 , 统计学表现为无显著性差别。从表 6, 表 7 结果可见, 给药 15d 和 18d 各用药组与对照组的 R 值差距缩小以至无显著性差异, 是由于对照组家兔角膜病变的自然愈合所致。

2 热毒清滴眼液的急性毒性试验和最大耐受剂量测定

2.1 材料

2.1.1 药物: 热毒清滴眼液, 杭州市中医院制剂室提供, 批号: 990422, 每 1 mL 相当于生药材 1.74g。

2.1.2 动物: ICR 小鼠, 20 只, 雌雄各半, 体重 20 ~ 22g, 浙江省实验动物中心提供, 雌雄分笼饲养, 喂全价饲料。动物饲养合格证: 浙实验动物准字(96)2001 号。

2.2 实验方法

ICR 小鼠 20 只, 雌雄各半, 体重 20 ~ 22g, 禁食 16h 后, 灌胃给予热毒清滴眼液每 1kg 体重 40mL, 每隔 5h 同样剂量灌胃给药 1 次, 共 3 次, 总剂量为每 1kg 体重 120mL, 相当于生药 20.88g/kg。观察给药后小鼠的毒性反应, 包括: 一般症状、外观、毛色、大小便、摄食情况、自主活动等, 以及 7d 内的死亡情况, 并于给药第 7 天称重。

2.3 实验结果

小鼠给药后自主活动、毛色、外观、摄食均正常, 首次给药 5h 左右可见大便颜色加深, 24h 后恢复正常, 其他未见异常反应。在 7d 的观察期内未见有小鼠死亡, 雌雄小鼠的体重均略有增长。见表 8。

表 8 热毒清滴眼液最大耐受量测定小鼠的体重变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 8 The body weight variation in mice with maximal tolerance dose of Reducing ($\bar{x} \pm s$)

性别	n	给药前(g)	给药后(g)
雄性	10	21.0 ± 0.86	24.0 ± 1.54
雌性	10	21.1 ± 0.79	22.9 ± 1.47

2.4 结论

ICR小鼠口服热毒清滴眼液 40 mL/kg,共3次,无明显的毒性反应,7d内无小鼠死亡。表明热毒清滴眼液的小鼠最大耐受剂量大于 120 mL/kg,相当于生药 20.88 g/kg。

3 热毒清滴眼液眼刺激性试验

3.1 材料

3.1.1 动物:家兔,新西兰种,雄性,体重 2.1 ~ 2.8 kg,双眼正常,购自浙江省实验动物中心,动物合格证号:浙实验动物准字(1996)001。

3.1.2 药物:热毒清滴眼液,杭州市中医院中药制剂室提供,批号:990422。

3.2 方法

3.2.1 家兔 4 只,分别于一侧眼睛滴入热毒清滴眼液 0.1 mL,被动闭合 10s,在另一侧滴入生理盐水 0.1 mL 作为对照,每天上下午各 1 次,连续 7d。实验第 2 天起每日给药前观察角膜、结膜等部位的刺激反应,直至停药后 1 周。

3.2.2 按文献[4]进行评分,并换算成刺激反应等级:

3.3 结果

给予热毒清滴眼液的 4 只兔眼未出现明显的刺激反应:结膜无充血、无水肿、无分泌物;角膜无混浊;虹膜正常。根据《指南》反应分级均为 0 级。

3.4 结论

热毒清滴眼液每天两次,每次 0.1 mL 给家兔滴眼,连续 7d,未出现眼刺激症状,眼刺激综合平均分为 0 分。可见热毒清滴眼液多次给药无明显的刺激反应。

4 讨论

热毒清滴眼液以祛肝热为原则,以黄连为主药,合龙胆、冰片等,有清热解毒、祛翳明目治疗 HSK 作用。

实验用家兔感染 HSV-1 形成角膜炎,具有来源广泛、眼睛红大易于观察实验结果等优点。HSV-1 对家兔角膜组织细胞具有高度敏感,先将角膜划痕再接种病毒,几天后即出现角膜炎,此时用荧光素染色可见病灶。家兔 HSK 模型与人类 HSK 发病过程完全相似。

本课题临床试验证明了雾化连续给药能起到强化药效作用。这是由于超声雾化能将药物颗粒击散到 5 μm 以下,有利于药物的生物利用。这个方法也是对传统医学“薰法”的改进,几千年历史证明其对热病有效。但热毒清雾化组与热毒清滴眼组二组疗效动物实验的差异水平没有临床试验差异显著,这可能与雾化给药时,兔眼是用别针将兔撑开,睁眼不到位,并且难以持久,药雾量不足有关。

无环鸟苷竞争性地抑制 HSV-1,对浅层性 HSK 和深层型 HSK 均有效,国内外眼科界认为它是一种较安全、首选的治疗 HSK 的药物^[5]。因此我们的实验结果是对热毒清滴眼液抗 HSV-1 作用的充分肯定。另外,无环鸟苷目前尚存在一些缺陷:口服只有 15% ~ 30% 生物利用度^[11];局部应

用可引起滤泡性结膜炎、浅点状角膜炎、假树枝状角膜炎等等,还偶见有引起急性肾功能衰竭和神经毒性报道^[12];对无环鸟苷耐药的毒株出现增多,对此目前也只能加强耐药性的监测,还没有针对的办法。因而通过试验还可以看出,热毒清滴眼液没有明显的不良反应,对人体是安全的优势。

滴眼液的刺激性较大时,由于局部刺激,使泪液分泌增多,泪液将药物浓度稀释,直接流出眼外,并通过泪道进入鼻腔或口腔,从而影响药物的吸收利用,降低药效。角膜的感觉神经丰富,密度是皮肤的 300 倍,感染 HSV-1 后,角膜上皮层、基质层出现浸润及溃疡病灶。病变部位的角膜知觉减退或消失,但其周围角膜知觉的敏感度可相对增强,因此对滴眼液的刺激性感受更加敏感。滴眼液的刺激性与 pH 值、渗透压、溶解度等因素有关。热毒清滴眼液制剂工艺科学合理,对实验家兔眼睛无刺激性,不引起畏光流泪、结膜红肿、分泌物增加、角膜混浊等病变。印证了临床患者热毒清滴眼液滴眼后感觉舒适,很乐意接受的原因。

由于治疗 HSK 主要用抗病毒药,但疗效能与抗病毒西药相比的中药制剂尚较少^[3]。本实验研究肯定了热毒清滴眼液对 HSK 至少取得与无环鸟苷相同的疗效,为今后的进一步深入研究和推广应用提供可靠的科学依据。

参考文献

- [1] 亢晓丽,金红,夏得昭,等. 士的宁及复方士的宁滴眼液抗 I 型单纯疱疹病毒(HSV-1)实验研究[J]. 中国实用眼科杂志, 1996, 14(12): 725.
- [2] Wander AH, Centifanto YM, Kaufman HE. Strain specificity of clinical isolates herpes simplex virus[J]. Arch Ophthalmol, 1980, 98: 1458.
- [3] 曾庆华,于晓林,李翔,等. 黄精多糖滴眼剂治疗实验性家兔单纯疱疹性角膜炎的研究[J]. 中国中医眼科杂志, 1998, 8(1): 7.
- [4] 吕圭源,王一涛主编. 中药新产品开发学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998, 378.
- [5] Panda A, Das GK, Khokhar S, et al. Efficacy of four antiviral agents in the treatment of uncomplicated herpetic keratitis[J]. Can J Ophthalmol, 1995 Aug, 30(5): 256.
- [6] Uchio E, Hatano H, Mitsui K, et al. A retrospective study of herpes simplex keratitis over the last 30 years[J]. Jpn J Ophthalmol, 1994, 38(2): 196.
- [7] Simon AL, Pavan Langston D. Long-term oral acyclovir therapy. Effect on recurrent infectious herpes simplex keratitis in patients with and without grafts[J]. Ophthalmology, 1996, 103(9): 1399; discussion 1404.
- [8] Oshry T, Lifshitz T. Intravenous acyclovir treatment for extensive herpetic keratitis in a liver transplant patient[J]. Int Ophthalmol, 1997-98, 21(5): 265.
- [9] Akova YA, Onat M, Duman S. Efficacy of low-dose and long-term oral acyclovir therapy after penetrating keratoplasty for herpes simplex keratitis[J]. Ocul Immunol Inflamm, 1999, 7

(1) :51 .

- [10] Tambasco FP , Cohen EJ , Nguyen LH , *et al* . Oral acyclovir after penetrating keratoplasty for herpes simplex keratitis[J] . Arch Ophthalmol ,1999 ,117(4) :445 .

- [11] De Miranda P . al . J Antimicrob Chemother ,1983 ,12(Suppl B) :29 .

- [12] Johnson GL . al . Ann Pharmacother ,1994 Apr ,28(4) :460 .

收稿日期 :2002-08-29