

# 土贝母皂甙对单纯疱疹病毒性角膜炎作用的实验研究

张晓辉, 王建明, 孙乃学

作者单位:(710004)中国陕西省西安市,西安交通大学医学院第二附属医院眼科

作者简介:张晓辉,男,在读博士研究生,主治医师,研究方向:角膜病、青光眼、眼前段。

通讯作者:张晓辉. tonyzxh0324@163.com

收稿日期:2010-10-11 修回日期:2010-11-17

## Experimental research on the efficacy of tubeimoside on herpes simplex keratitis

Xiao-Hui Zhang, Jian-Ming Wang, Nai-Xue Sun

Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

**Correspondence to:** Xiao-Hui Zhang. Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. tonyzxh0324@163.com

Received:2010-10-11 Accepted:2010-11-17

## Abstract

• **AIM:** To evaluate the efficacy of tubeimoside (Tu) on herpes simplex keratitis (HSK) of rabbits.

• **METHODS:** HSK models were established in 24 rabbits, which were randomly divided into 4 groups: normal saline (NS), acyclovir (ACV), Tu and Tu combined with recombinant bovine basic fibroblast growth factor (bFGF). All eyes were examined and corneal samples' lesions dynamic changes were selectively observed by slit-lamp microscope, scanning and transmission electron microscope.

• **RESULTS:** Among 4 groups of NS, ACV, Tu and Tu + bFGF, corneal epithelial involvement scores (CEIS) showed significant difference ( $P < 0.01$ ); compared ACV with Tu or Tu + bFGF respectively, CEIS had significant difference ( $P < 0.05$ ), as well as that between Tu and Tu + bFGF ( $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** There is curative effect on HSK with Tu (0.4g/L), and the therapeutic effect can be enhanced when combined with bFGF except for slight stimulatory.

• **KEYWORDS:** tubeimoside; herpes simplex virus; keratitis

Zhang XH, Wang JM, Sun NX. Experimental research on the efficacy of tubeimoside on herpes simplex keratitis. *Gujing Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(1):22-24

## 摘要

**目的:**探讨土贝母皂甙(tubeimoside, Tu)对兔单纯疱疹病毒性角膜炎(herpes simplex keratitis, HSK)作用的效果。

**方法:**选取24只兔建立HSK模型,随机分4组,即生理盐水、阿昔洛韦、Tu和Tu联合应用重组牛碱性成纤维细胞生长因子(recombinant bovine basic fibroblast growth factor, bFGF)。裂隙灯显微镜、扫描电镜和透射电镜观察眼部病变的动态变化。8只兔左眼滴0.4g/L Tu,右眼滴生理盐水。

**结果:**Tu、阿昔洛韦、Tu + bFGF与生理盐水4组间比较,角膜上皮病变分值(corneal epithelial involvement scores, CEIS)均有显著性差异( $q = 7.75, 20.50, 22.17, P < 0.01$ )。阿昔洛韦组和Tu组、Tu + bFGF组相比,CEIS差异有显著性( $t = 2.1, 1.9, P < 0.05$ )。Tu组与Tu + bFGF相比,CEIS有显著性差异( $t = 2.17, P < 0.05$ )。

**结论:**采用0.4g/L Tu治疗实验性HSK有一定的疗效,联合应用bFGF可以增强Tu治疗HSK的疗效。0.4g/L Tu滴眼有轻度刺激性。

**关键词:**土贝母皂甙;单纯疱疹病毒;角膜炎

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.01.008

张晓辉,王建明,孙乃学. 土贝母皂甙对单纯疱疹病毒性角膜炎作用的实验研究. 国际眼科杂志 2011;11(1):22-24

## 0 引言

单纯疱疹病毒性角膜炎(herpes simplex keratitis, HSK)主要是由单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV) 1型引起的角膜病,是最常见的感染性角膜病,90%成人血清HSV抗体阳性<sup>[1]</sup>。国内角膜病患者50%为HSV感染引起,HSK在角膜病致盲原因中占居首位。药物是治疗HSK最有效的方法,然而目前治疗HSK的药物有3个问题:药物的毒性、复发HSK的根治和耐药毒株的产生,其中以前两个为主。目前国内外学者仍在不断寻求安全有效的抗HSV-1新型药物。在原代兔肾细胞培养的体外试验和动物体内试验中我们发现,土贝母皂甙(tubeimoside, Tu)对HSV-1和HSK有一定的抑制作用。通过前期药物刺激性试验和药物疗效,我们筛选出5, 2, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1,  $8 \times 10^{-2}$ ,  $8 \times 10^{-3}$ ,  $8 \times 10^{-4}$ g/L Tu点眼,其中浓度为0.4, 0.2, 0.1g/L Tu刺激性小且药效好,对此我们继续深入实验,研究Tu的疗效<sup>[2]</sup>。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康长耳白兔32只(西安交通大学实验动物中心提供),体质量2.5~3.5kg,雌雄不限,裂隙灯显微镜下检查双眼无疾病。土贝母皂甙滴眼液(西安交通大学医学院第二附属医院中药研究室提供);阿昔洛韦眼液(acyclovir, ACV, 8g/L, 武汉武警制药厂生产);生理盐水(normal saline, NS, 9g/L, 西安京西制药厂生产);重组牛碱性成纤维细胞生长因子(recombinant bovine basic fibroblast growth factor, bFGF, 2.4M AU/L, 珠海东大生物制药有限公司生产提供)。

## 1.2 方法

**1.2.1 Tu滴眼剂治疗兔HSK的观察** 细胞培养:用乳地鼠肾建立BHK-21传代地鼠肾细胞系。(1)胰蛋白酶消化

法分散单层细胞,生长液稀释培养液 20 倍;(2) 试管接种 0. 5mL 细胞悬液,37℃ 培养 4d 形成单层细胞;(3) 接种病毒前弃去生长液,换维持液。病毒扩增:HSV-1 SM44 株毒接种在 BHK 单层细胞上,接种第 2d 开始在倒置显微镜下观察 CPE(细胞病变效应)。第 3d 吹打细胞与瓶壁脱落,获得病毒原液 3mL。TCID<sub>50</sub>(半数组织培养感染量)为(10~100) × 10<sup>-6</sup>,病毒原液冻存于-20℃ 低温冰箱备用。制作兔 HSK 模型:24 只兔 48 眼用 4g/L Benoxil 滴眼 3 次表面麻醉后,4. 5 号针头上皮层井字划痕,长度 4. 5~5. 5mm,深度 0. 5mm,微量取样器吸取 HSV-1 SM44 毒株原液 30μL 滴入结膜囊,闭眼轻揉 30s。分组、给药:24 只兔随机分 4 组,即 NS, ACV, Tu 和 Tu 联合应用 bFGF。接种病毒后 18h 开始给药。滴眼 5 次/d, 2 滴(100μL)/次,间隔 2h,持续 20d。联合用药组两种药物,每次滴眼间隔 15min。每组 8 只兔 16 眼,双眼接受同样治疗。裂隙灯显微镜观察:每天在裂隙灯显微镜下观察病变程度、评分、拍片记录。角膜上皮病变评分标准采用 Trousdale 记分法<sup>[2]</sup>。其他评价参数包括眼睑、结膜、虹膜和房水,其中以角膜上皮病变分值(corneal epithelial involvement score, CEIS)为主要指标。电镜观察:接种病毒后第 7, 14, 20d, 分别从 Tu 和 NS 组中各取 1 只兔角膜标本(取角膜病变接近平均计分)。接种后第 14d, 从 ACV 组中取 1 只兔角膜标本,透射电镜和扫描电镜下观察并拍片记录。透射电镜样品经 25g/L 戊二醛和四氧化锇双固定、浸洗,乙醇和丙酮梯度脱水,环氧树脂包埋,制作超薄切片,醋酸铅、柠檬酸铅染色。扫描电镜样品经乙腈置换,真空干燥和喷金。

**1. 2. 2 Tu 滴眼剂兔眼刺激性实验** 选取 8 只兔左眼滴 0. 4g/L Tu, 右眼滴 NS。给药 7d, 停药后观察至第 10d。滴眼方法为 5 次/d, 2 滴(100μL)/次, 间隔 2h。每日在裂隙灯下观察,按卫生部药政局眼刺激性试验的新药评估标准进行评分<sup>[2]</sup>。

统计学分析:使用 SPSS 13. 0 医学统计软件包进行数据处理。组间资料比较采用 Student-Newman-Keuls 方法(*q* 检验)和 *t* 检验,取  $\alpha = 0. 05$  为检验水准。

## 2 结果

**2. 1 Tu 滴眼剂治疗兔 HSK 的疗效** 裂隙灯显微镜观察:接种病毒后 12h, 所有兔角膜上皮均出现点状、棒状病灶。(1) NS 组:角膜病变发展很快, 病变程度为各组中最重。Tu, ACV 和 Tu + bFGF 分别与 NS 比较, CEIS 均有显著性差异( $q = 7. 75, 20. 50, 22. 17, P < 0. 01$ )。接种后第 2d 形成典型树枝状病灶。第 6~8d 时形成大面积地图状溃疡, 上皮病变面积以后逐渐缩小, 愈合, 但基质水肿、浸润明显开始加重。第 13~14d 时形成圆形溃疡。眼睑疱疹发病率为 37. 5%, 结膜炎、虹膜炎发病率为 100%, 前房积脓发病率 25%。(2) ACV 组和 Tu 组、Tu + bFGF 组相比, CEIS 差异有显著性( $t = 2. 1, 1. 9, P < 0. 05$ )。ACV 组病变以点状病灶为主, 基质水肿、浸润轻, 第 9~12d 上皮迅速愈合。实验过程中 ACV 组未见眼睑疱疹发生, 结膜炎发病率 62. 5%, 虹膜炎发病率 50%, 无前房积脓。(3) Tu 组:上皮及基质病变均有所减轻。与 Tu + bFGF 相比, CEIS 有显著性差异( $t = 2. 17, P < 0. 05$ )。角膜上皮病变在第 6~7d 时达到高峰, 形成树枝状或地图状溃疡, 第 9~10d 后病变面积逐渐缩小, 第 14d 形成较小的圆形溃疡, 基质水肿, 呈灰白色。第 18~20d, 上皮基本愈合, 荧光素染色(-)。实验中仅 1 例疑为眼睑疱疹, 结膜炎发病率为

100%, 虹膜炎发病率为 75%, 无前房积脓。(4) Tu + bFGF 组:角膜病变轻, 较局限。病变以棒状病灶为主, 无明显溃疡形成, 病变愈合很快。接种后第 2d, 角膜上皮均出现棒状、树枝状病灶, 平均评分为 1. 5, 第 6~7d 时到达高峰, 平均评分为 2. 68~3. 1 之间, 形成树枝状溃疡, 散在一些点状、棒状病灶, 病变面积占角膜面积 75% 左右, 第 9d 以后上皮病变面积迅速缩小, 第 10d 平均评分为 1. 33, 第 14d 减少到 0. 13, 表现为局限的圆形溃疡灶, 基质浸润较明显。第 18~20d, 上皮病变基本消失。14d CEIS 平均分为 1. 53。电镜观察:(1) 扫描电镜 NS 组:感染第 7d, 溃疡区大量细胞碎片、核质碎屑, 微绒毛消失。感染第 14d, 微绒毛基本恢复。胞膜表面有大小不等的孔洞或破裂, 周围可见少数早期病变细胞。Tu 组:感染第 7d, 病变上皮细胞变圆, 突出于表面、松解或脱落。微绒毛分布不均。感染第 14d, 上皮修复。上皮细胞形态较规则, 微绒毛排列整齐, 胞膜表面孔洞较少。感染第 20d, 上皮细胞尚未完全恢复正常多边形形态。Tu + bFGF 组和 ACV 组类同:感染第 14d, 角膜上皮细胞形态恢复正常, 为典型多边形, 微绒毛排列整齐, 分布均匀, 细胞膜表面基本完整。(2) 透射电镜 NS 组:病程第 7d, 微绒毛完全消失, 细胞呈现均质化。病程第 14d, 上皮细胞增生愈合, 微绒毛形成, 细胞层次可见 3~4 层, 染色质边集, 线粒体扩张呈囊泡状。感染后第 20d, 细胞结构仍紊乱不清。Tu 组:感染第 7d, 微绒毛减少或部分消失, 细胞层次有 2~3 层, 染色质边集。感染第 14d, 微绒毛恢复, 但排列不规则, 细胞层次有 7~8 层。线粒体轻度肿胀, 粗面内质网扩张。细胞排列结构较整齐。感染第 20d, 胞浆中微丝增多, 细胞内空泡减少, 核形渐趋规则。Tu + bFGF 组和 ACV 组类同:感染第 14d, 微绒毛排列整齐, 细胞层次为 7~8 层, 核形较规则, 染色质部分边集。细胞器发达, 胞浆中微丝和粗面内质网较多, 线粒体无肿胀变性。细胞间桥粒连接紧密, 细胞外胶原纤维排列整齐。

**2. 2 Tu 滴眼剂兔眼刺激性实验结果** 采用 0. 4g/L Tu 滴眼出现混合充血, 分泌物增多, 个别出现角膜轻度混浊, 虹膜轻度充血, 瞳孔光反正常, 平均积分 4. 07, 具有轻度刺激性。停药后 0. 4g/L Tu 刺激性症状逐渐缓解, 充血减轻, 分泌物减少, 平均积分 1. 3。0. 4g/L Tu 与 NS 刺激性有显著差异( $P < 0. 01$ )。

## 3 讨论

Tu 是从中国传统中药土贝母中提炼出来, 经层析分离和降解产生的水溶性成份, 得到的 6 个水溶性化合物。土贝母又称地苦胆, 是中国特有药用植物, 具有药理作用的是其水溶性成分中的甙甲, 主要为抗肿瘤和抗病毒作用。土贝母皂甙抗病毒谱主要包括乳头多瘤空泡病毒中人疣病毒、痘病毒中传染性软疣病毒和 HSV-1 型。在原始兔肾细胞上接种不同浓度药物与病毒原液各 0. 5mL 评价药效, 结果 Tu 浓度在  $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-4}$  g/L 对 HSV-1 具抑制作用<sup>[3, 4]</sup>。

Tu, ACV 和 Tu + bFGF 组均可减轻角膜病变程度, 使 CEIS 评分下降。ACV、Tu + bFGF 组疗效均优于 Tu 组。但 Tu 和 Tu + bFGF 组使 CEIS 评分下降程度不及 ACV。对眼睑疱疹、结膜炎、虹膜炎、前房积脓等指标, 治疗效果类似于 CEIS 指标。bFGF 主要作用是促进角膜上皮修复, 与 Tu 联用疗效提高, 能进一步促进角膜上皮愈合。上皮修复后, 从角膜基质细胞形态、层次、结构、细胞间连接和细胞器的病理损害观察, Tu 组一定程度上减轻了病理损害

的发生、发展,抑制病毒向周围邻近细胞扩散,缩小病灶范围,具有一定保护易感细胞的作用。与NS组相比,Tu组病变范围局限,细胞结构与细胞器损害较轻,与ACV组相比,效果略差,但是Tu+bFGF组与ACV药物对照组电镜下改变一致。Tu的疗效次于ACV,是否与实验中Tu的制剂有关,目前正在做进一步的实验,以达到期望的治疗效果。眼刺激性实验在正常、完整的兔活体角膜组织上进行,观察药物对结膜、角膜、虹膜组织的毒副作用。结果表明,0.4g/L Tu有轻度眼刺激性。

兔眼 HSK 病程通常为 14~20d,20d 后潜伏感染建立。有的兔发生 HSV 性脑炎而死亡,多发生在急性期(感染后 3~7d),因此选择接种病毒后第 7d,CEIS 最高时取材作电镜标本,接种后第 14d,CEIS 趋于稳定,从第 14~20d 各组 CEIS 变化不明显。完整的角膜上皮细胞层是保持角膜生理功能和抵御微生物侵袭的重要屏障,鳞状上皮细胞间带状连接、细胞间黏合、桥粒以及交错式分布,形成严密的防御屏障<sup>[5-7]</sup>。从 NS 组的扫描电镜和透射电镜结果可见 HSV-1 感染角膜上皮细胞过程。病毒首先吸附进入细胞,在细胞核内进行子代病毒复制和装配,同时胞膜表面微绒毛融合,细胞间连接松散、破坏,胞浆中线粒体肿胀、囊泡样变性,嵴断裂,粗面内质网扩张,核糖体脱落,微丝减少,胞核肿胀、染色质边集,核固缩、溶解,细胞圆化坏死、脱落<sup>[8,9]</sup>。实验中发现病毒感染角膜上皮细胞后,首先表现为胞核膨隆增大,进而胞浆收缩、细胞变圆成为病变细胞。当病毒可溶性抗原弥散到实质浅层,可出现一过性上皮浸润。接种第 7d,透射电镜下 NS 组细胞结构及胶原纤维完全破坏,溶解、消失,呈现均质化,微绒毛、细胞核、细胞间桥粒连接等细胞器全部消失。Tu 组细胞层次有 2~3 层,胶原纤维未完全破坏,微绒毛部分存留,胞浆中有较多微丝,并且散在一些桥粒连接。鳞状细胞层空泡多,翼状细胞层空泡变性少。不难看出 Tu 组较 NS 组超微结构损害轻。从扫描电镜观察感染第 7d,NS 组呈现弥漫病灶,病变深、范围广,圆化病变细胞多,大量崩解细胞碎片,胞核碎屑。Tu 组圆化病变细胞较多,与 NS 组相比病灶较浅、局限。表层上皮细胞仍部分保留其正常形态和结构。接种第 14d 透射电镜结果显示,NS 组上皮部分修复,修复的上皮细胞表面出现短小、稀疏微绒毛,细胞结构及细胞间桥粒连接部分建立,细胞器处于病理损害阶段。ACV 组上皮修复完整,细胞排列规则,细胞正常结构建立,细胞器发达,较多高尔基体,提示细胞蛋白质合成旺盛,分泌功能增强。Tu 组上皮基本完全修复,细胞结构趋

于规则,细胞器结构基本恢复正常,较多线粒体,上皮细胞中间层空泡较多,Tu 组超微结构改变明显好于 NS 组,但略差于 ACV 组。从扫描电镜结果可见接种第 14d,NS 组角膜表层上皮细胞大多恢复正常多边形形态,胞膜表面有较多孔洞和裂解的细胞碎片,同时有少量圆化病变细胞。Tu 组表层细胞胞膜表面孔洞和坏死组织少,细胞形态规则,排列紧密整齐。ACV 组表层上皮细胞的形态、结构正常,微绒毛排列整齐,分布均匀,胞膜表面完整,坏死组织和圆化细胞极少,扫描电镜结果与透射电镜、裂隙灯下观察结果一致。综上所述,不同时期 Tu 组均优于 NS 组,较 ACV 组略差。接种病毒第 20d,透射电镜和扫描电镜下观察各组较第 14d 细胞超微结构改变不明显,有一定程度的好转。

#### 参考文献

- 1 Kaye S, Choudhary A. Herpes simplex keratitis. *Prog Retin Eye Res* 2006;25(4):355-380
- 2 张晓辉,孙乃学,王峰,等.单纯疱疹病毒性角膜炎土贝母皂点眼的浓度筛选与刺激性评价. *西安交通大学学报(医学版)* 2003;24(1):63-67
- 3 Liang MJ, Zhang WD, Zhang C, et al. Quantitative determination of the anticancer agent tubeimoside I in rat plasma by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;845(1):84-89
- 4 Xu Y, Chiu JF, He QY, et al. Tubeimoside-1 exerts cytotoxicity in HeLa cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress pathways. *J Proteome Res* 2009;8(3):1585-1593
- 5 Carlson EC, Drazba J, Yang X, et al. Visualization and characterization of inflammatory cell recruitment and migration through the corneal stroma in endotoxin-induced keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(1):241-248
- 6 Hamrah P, Cruzat A, Dastjerdi MH, et al. Corneal sensation and subbasal nerve alterations in patients with herpes simplex keratitis: an *in vivo* confocal microscopy study. *Ophthalmology* 2010;117(10):1930-1936
- 7 Frank GM, Divito SJ, Maker DM, et al. A novel p40-independent function of IL-12p35 is required for progression and maintenance of herpes stromal keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(7):3591-3598
- 8 Chentoufi AA, Dasgupta G, Christensen ND, et al. A novel HLA (HLA-A \* 0201) transgenic rabbit model for preclinical evaluation of human CD8+ T cell epitope-based vaccines against ocular herpes. *J Immunol* 2010;184(5):2561-2571
- 9 Imai T, Sagou K, Arai J, et al. Effects of phosphorylation of herpes simplex virus 1 envelope glycoprotein B by Us3 kinase *in vivo* and *in vitro*. *J Virol* 2010;84(1):153-162