

# 局部应用环孢素A 0.05%、环孢素A 2%、盐酸依匹斯汀0.05%与醋酸泼尼松龙1%对实验性过敏性结膜炎模型中过敏性炎症影响的比较

原文标题: Comparison of the Effects of Topical Cyclosporine A 0.05%, Cyclosporine A 2%, Epinastine Hydrochloride 0.05%, and Prednisolone Acetate 1% on Allergic Inflammation in an Experimental Allergic Conjunctivitis Model

Cornea 2013;32:1465–1469 · Bilak Semsettin, MD; Emre Sinan, MD; Vardi Nigar, PhD

## 摘要

目的: 在实验性过敏性结膜炎模型中, 研究局部应用环孢素A 0.05%、环孢素A 2%、盐酸依匹斯汀0.05%和醋酸泼尼松龙1%的作用。

方法: 将40只Wistar白化雄性大鼠随机分为5组。所有大鼠均经腹腔注射100 mg卵白蛋白进行免疫。2周后开始局部给药: 第1组给予环孢素A 0.05%, 每日4次; 第2组给予环孢素A 2%, 每日4次; 第3组给予盐酸依匹斯汀0.05%, 每日2次; 第4组给予醋酸泼尼松龙1%, 每日4次; 连续给药7天。第5组设为对照组。于研究第22天摘除大鼠双眼。切除的组织切片以甲苯胺蓝染色进行肥大细胞计数, 以苏木精-伊红染色进行组织病理学评估。

结果: 与对照组相比, 两种环孢素A制剂和依匹斯汀在组织病理学评分上比醋酸泼尼松龙更有效 ( $P < 0.05$ )。各治疗组与对照组之间肥大细胞数量差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 但各治疗组之间肥大细胞数量未见差异。

结论: 在实验性过敏性结膜炎模型中, 局部应用0.05%环孢素A在抑制肥大细胞介导的I型过敏性结膜炎方面与2%环孢素A和依匹斯汀同样有效。

关键词: 过敏性结膜炎, 环孢素A, 依匹斯汀, 醋酸泼尼松龙

## 引言

尽管已开展了大量研究并开发了多种新药, 过敏性结膜炎在某些病例中仍可转为慢性, 并导致后遗症甚至失明。由于大气中过敏原数量的变化, 过敏症状的严重程度也各不相同。为获得准确的研究结果, 所有病例需处于相同的大气和地理条件下。因此, 研究者建立了眼部过敏的动物模型。<sup>1</sup>

尽管存在冷敷、人工泪液等非特异性治疗选择, 免疫调节药物治疗仍是目前过敏性结膜炎治疗的基石。<sup>2</sup> 环孢素A是一种非甾体类免疫调节药物, 具有多重抑制作用, 包括抑制抗原诱导的T淋巴细胞活化以及抑制细胞凋亡。<sup>3</sup> 以人工泪液、橄榄油、玉米油或蓖麻油配制的不含防腐剂的2%环孢素A乳剂, 已成功用于对糖皮质激素耐药的春季角结膜炎 (VKC) 和特应性角结膜炎 (AKC) 病例。<sup>4–8</sup> 少数研究考察了市售0.05%环孢素A制剂在VKC、AKC和过敏性结膜炎中的应用。然而, 这些研究均在人体中进行, 仅使用单一浓度, 且以临床症状和体征的消退为依据。<sup>9–11</sup> 盐酸依匹斯汀是一种多效药物, 不仅是抗组胺药, 还是具有抗炎作用的肥大细胞稳定剂。<sup>12</sup> 在局部用糖皮质激素中, 醋酸泼尼松龙的生物利用度和眼内渗透率最高。<sup>13</sup>

本研究旨在实验性过敏性结膜炎模型中, 研究并比较局部应用环孢素A 0.05%、环孢素A 2%、盐酸依匹斯汀0.05%和醋酸泼尼松龙1%的作用。

## 材料与方法

本研究使用40只体重250 ~ 300 g的Wistar白化雄性大鼠。大鼠饲养于Inonu大学实验动物生产与研究中心的无病原体动物设施中, 并按照视觉与眼科学研究协会 (ARVO) 关于科研用动物的决议进行处理。伦理批

准由Inonu大学地方伦理委员会出具。

免疫与局部给药

将大鼠分为5组。所有大鼠均经腹腔注射100 mL溶液致敏，该溶液含100 mg卵白蛋白（OVA，V级；Sigma Immunochemicals，圣路易斯，密苏里州）及作为佐剂的20 mg Al(OH)<sub>3</sub>（200 mg/mL；Sigma Immunochemicals）。1,14,15

分组

致敏完成2周后，各组接受为期7天的每日给药：第1组大鼠眼部给予环孢素A 0.05%（Restasis）滴眼液，每日4次；第2组给予环孢素A 2%（以人工泪液配制的溶液），每日4次；第3组给予盐酸依匹斯汀0.05%（Relestat），每日2次；第4组给予醋酸泼尼松龙1%（Pred Forte），每日4次。第5组设为对照组，不给予任何额外治疗。

组织病理学分析

实验第21天，在最后1次滴药前1小时，向每只大鼠双眼结膜穹窿部给予10 mL以磷酸盐缓冲盐水配制的、浓度为100 mg/mL的卵白蛋白进行激发。15 激发24小时后对大鼠进行临床评估，随后以150 mg/kg肌内注射盐酸氯胺酮（Ketalar，Parke-Davis）和15 mg/kg赛拉嗪（Rompun，Bayer）麻醉。处死动物后，剝除大鼠双眼，包括上下眼睑及结膜。组织固定于10%中性缓冲甲醛溶液中。经常规组织处理后石蜡包埋，切取5 μm切片，用于苏木精-伊红染色和甲苯胺蓝染色。在苏木精-伊红染色切片中分析结膜的一般结构，在甲苯胺蓝染色切片中分析肥大细胞计数。

在苏木精-伊红染色切片中，通过分析上皮结构、结缔组织基质水肿、炎性细胞浸润及肥大细胞脱颗粒来评估结膜的一般结构。根据组织病理学状况将变化分为：无（0）、轻度（1）、中度（2）、重度（3）。将这4个权重相同的参数评分相加，获得每只大鼠的组织病理学评分数据，并计算各组均值（表1）。最高组织病理学评分为12分。使用Leica QWin分析系统（Leica Microsystems，布法罗格罗夫）在10×镜头下计数结膜5个不同区域的肥大细胞（表1）。具有5个或以上细胞外颗粒的肥大细胞视为脱颗粒细胞。16 为尽量减少技术相关变量，由同一名研究者负责给药及摘取眼球操作。切片的显微镜评估亦由同一名研究者在盲法下完成，以尽量减少偏倚。

表1 各组组织病理学评分均值与肥大细胞计数值，以及Kruskal–Wallis检验的组间比较

| 组别 | 组织病理学评分均值 | 肥大细胞计数均值  |
|----|-----------|-----------|
| 1  | 3.0 ± 0.7 | 4.5 ± 1.6 |
| 2  | 3.7 ± 1.1 | 4.3 ± 0.9 |
| 3  | 3.1 ± 1.1 | 5.0 ± 1.3 |
| 4  | 5.8 ± 0.6 | 4.1 ± 1.6 |
| 5  | 7.7 ± 1.2 | 7.1 ± 0.6 |
| P  | 0.000     | 0.001     |

统计学分析

采用Kolmogorov–Smirnov检验评估各组分布是否呈正态。两个参数的所有组分布均为正态。采用Kruskal–Wallis检验进行组间比较，结果显示差异有统计学意义（表1）。随后对有统计学意义的结果采用Mann–Whitney U检验进行组间比较（表2）。P < 0.05认为差异有统计学意义。

结果

各组平均组织病理学评分和肥大细胞数量见表1。第1至第5组的组织病理学评分分别为3.0 ± 0.7、3.7 ± 1.1、3.1 ± 1.1、5.8 ± 0.6和7.7 ± 1.2。两种环孢素A制剂和依匹斯汀比醋酸泼尼松龙更有效（表2），但

这3组之间未见差异。第1至第5组的肥大细胞计数分别为 $4.5 \pm 1.6$ 、 $4.3 \pm 0.9$ 、 $5.0 \pm 1.3$ 、 $4.1 \pm 1.6$ 和 $7.1 \pm 0.6$ 。治疗组与对照组之间差异有统计学意义（表2），但各治疗组之间无显著差异。我们在第4组和第5组中观察到明显的炎性细胞浸润、上皮剥脱、肥大细胞脱颗粒及结缔组织水肿（图1）。对照组的炎症表现最为严重。

表2 组织病理学评分与肥大细胞计数组间比较（Mann-Whitney U检验）的P值

| 指标      | 1-2组  | 1-3组  | 1-4组  | 1-5组  | 2-3组  | 2-4组  | 2-5组  | 3-4组  | 3-5组  | 4-5组  |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 肥大细胞    | 0.738 | 0.415 | 0.746 | 0.001 | 0.300 | 0.871 | 0.001 | 0.309 | 0.003 | 0.001 |
| 组织病理学评分 | 0.201 | 0.912 | 0.001 | 0.001 | 0.294 | 0.004 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.003 |

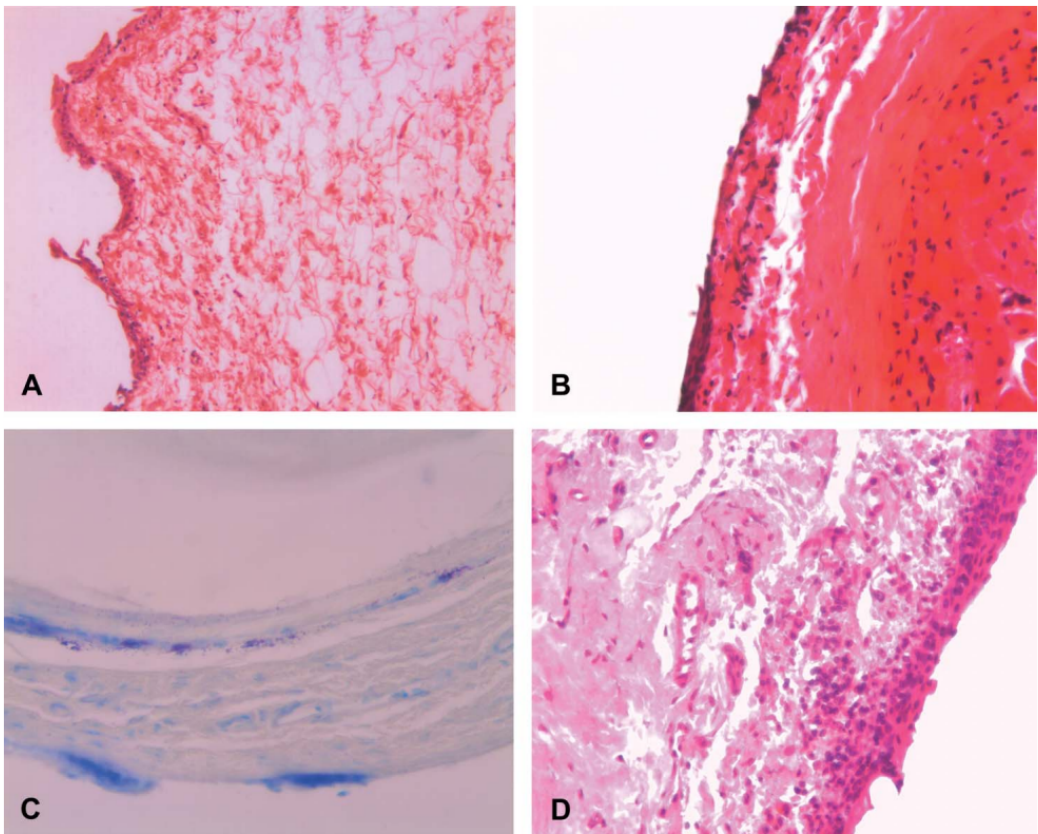


图1 结膜组织学切片。A：上皮剥脱、结缔组织水肿（苏木精-伊红染色 ×40，第4组）。B：上皮剥脱（苏木精-伊红染色 ×40，第5组）。C：脱颗粒肥大细胞（甲苯胺蓝染色 ×40，第5组）。D：观察到显著的炎性细胞浸润（苏木精-伊红染色 ×40，第5组）。

### 讨论

环孢素A可同时抑制I型和IV型变态反应，但其对IV型变态反应的作用更为显著。3 在大鼠中进行的研究提示，抗原特异性T细胞在实验性过敏性睑结膜炎的发生中起关键作用。17 环孢素A是一种免疫调节药物，不仅抑制T细胞，还抑制抗原提呈细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的活化以及结膜上皮细胞的凋亡。18,19 在对糖皮质激素耐药或依赖的VKC和AKC治疗中，环孢素A被用作助减激素药物。3,8 局部应用环孢素A可使眼部组织达到适当的药物浓度，并避免许多全身性副作用。20 目前，环孢素A浓度与过敏性结膜炎治疗之间尚无明确的剂量-反应关系。

尽管有许多研究探讨了局部2%环孢素A的临床疗效，但考察局部0.05%环孢素A（获批用于干眼治疗）在过敏性结膜炎中疗效的研究很少。4-11 这些研究仅使用单一浓度，且基于人体临床症状和体征。此外，尚无研究比较市售0.05%环孢素A与2%环孢素A。临床研究多以患者每日主观症状评分为依据，目前尚无客

观评估过敏症状严重程度的方法。以卵白蛋白在大鼠中建立的IgE介导的实验性过敏性结膜炎模型与人类生理及过敏反应结果非常相似。其临床改变（结膜水肿）和组织病理学改变（肥大细胞脱颗粒）与人类眼部过敏的血管通透性变化非常相似。<sup>1,21,22</sup> 我们在本研究中考察了肥大细胞浸润以及结膜的炎症性病理改变（上皮结构、结缔组织水肿、炎性细胞浸润和肥大细胞脱颗粒）。肥大细胞通过其释放的介质在过敏反应的早期和晚期阶段均发挥重要作用。<sup>23,24</sup> 在一项结膜组织的实验研究中，结膜组织中增加的肥大细胞数量与过敏性结膜炎症状的严重程度相关。<sup>25</sup> 研究者指出，有症状过敏患者的结膜活检标本中脱颗粒肥大细胞计数增加。<sup>26</sup> 过敏反应中的介质分泌，特别是组胺分泌，是炎性细胞浸润、水肿、瘙痒、发红、成纤维细胞增殖、结膜血管扩张及血管通透性增加等早期表现的原因。<sup>24</sup> 本研究中，各治疗组之间未见差异，而治疗组与对照组之间肥大细胞数量差异有统计学意义。El-Asrar等<sup>27</sup>采用免疫组织化学方法评估了6例重度VKC患者经2%环孢素A治疗3周后的情况。尽管肥大细胞数量未改变，作者检测到炎性细胞浸润的减少无统计学意义。他们认为局部环孢素治疗观察到的VKC临床改善可能源于其免疫调节作用。在Hingorani等开展的一项研究中，对AKC患者给予环孢素A 2%或安慰剂每日4次、持续3个月，随后行结膜活检取样。作者得出结论：局部环孢素A降低了T细胞计数和活化水平，使CD4/CD8比值恢复正常，且未导致肥大细胞计数的任何差异。因此，作者认为局部环孢素A具有免疫调节作用，对I型超敏反应的影响极小。<sup>28</sup> 在Keklikci等<sup>11</sup>开展的另一项研究中，研究者指出，根据印迹细胞学结果，环孢素A 0.05%治疗降低了浸润至结膜的炎性细胞密度，并改善了结膜上皮的形态。在我们的组织病理学研究中，未观察到0.05%与2%两种浓度环孢素A之间存在统计学显著差异。我们的数据显示，除对T细胞介导的IV型变态反应的作用外，局部环孢素在两种浓度下均能有效抑制肥大细胞介导的I型实验性过敏性结膜炎。环孢素是一种免疫调节药物，可减少肥大细胞浸润和脱颗粒，并抑制炎性细胞向结膜浸润。此外，环孢素似乎改善了上皮的保存，这与炎症减轻及结膜上皮细胞凋亡减少的研究结果一致。<sup>29</sup>

由于局部糖皮质激素作用强大，目前仍用于重度过敏性结膜炎病例的治疗。<sup>30</sup> 与糖皮质激素相比，环孢素A发挥的是免疫调节作用而非免疫抑制作用。<sup>3</sup> 糖皮质激素长期使用后还具有较强的潜在副作用，如青光眼和白内障形成。部分患者可能对局部糖皮质激素产生耐药、不耐受或依赖。<sup>3,30</sup> 在肥大细胞计数方面，我们未观察到醋酸泼尼松龙、两种浓度环孢素A与依匹斯汀之间的差异。然而，以组织病理学评分评估时，环孢素A 0.05%组、环孢素A 2%组、依匹斯汀组与醋酸泼尼松龙组之间差异有统计学意义。糖皮质激素主要阻止迟发相过敏反应，对早期反应的作用较弱。<sup>30</sup> 糖皮质激素也可抑制肥大细胞数量的增加，但不足以阻止这些细胞脱颗粒。<sup>25</sup> 由于肥大细胞脱颗粒在早期阶段最为集中，糖皮质激素不足以阻止早期表现（结缔组织水肿、细胞浸润和肥大细胞脱颗粒）。Whitcup等<sup>18</sup>在小鼠实验性过敏性结膜炎模型中，比较了3种不同浓度局部环孢素A（0.05%、0.2%和0.4%）与1%局部醋酸泼尼松龙治疗的疗效。作者认为，环孢素A治疗动物的结膜结构得到更好保护，且结膜水肿程度较轻。尽管有这些发现，作者未发现颗粒化或脱颗粒肥大细胞及其他炎性细胞计数在任何组间存在显著差异。我们未发现依匹斯汀组与两个环孢素A组之间在这些参数上存在差异。然而，依匹斯汀兼具抗组胺、肥大细胞稳定和抗炎特性，可以解释这一情况。<sup>12</sup> Shii等<sup>31</sup>研究了环孢素A、酮替芬和倍他米松对过敏性结膜炎模型早期反应的影响。其结果提示环孢素A可抑制由肥大细胞脱颗粒介导的I型过敏性结膜炎早期反应。他们发现的效价顺序为：单次激发模型中酮替芬 > 环孢素A > 倍他米松。我们的结果与其报告一致。

在实验性过敏性结膜炎模型中，局部0.05%环孢素A在抑制肥大细胞介导的I型过敏性结膜炎方面与2%环孢素A和依匹斯汀同样有效，且优于糖皮质激素。对于对糖皮质激素耐药或依赖的慢性过敏性结膜炎患者，可尝试将其作为替代治疗方案。

## 参考文献

1. Groneberg DA, Bielory L, Fischer A, et al. Animal models of allergic and inflammatory conjunctivitis. *Allergy*. 2003;58:1101–1113.
2. Solomon A, Pe'er J, Levi-Schaffer F. Advances in ocular allergy: basic mechanisms, clinical patterns and new therapies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2001;1:477–482.

3. Foulks GN. Topical cyclosporine for treatment of ocular surface disease. *Int Ophthalmol Clin.* 2006;46:105–122.
4. Doan S, Gabison E, Abitbol O, et al. Efficacy of topical 2% cyclosporine A as a steroid-sparing agent in steroid-dependent vernal keratoconjunctivitis [in French]. *J Fr Ophtalmol.* 2007;30:697–701.
5. Kiliç A, Gürler B. Topical 2% cyclosporine A in preservative-free artificial tears for the treatment of vernal keratoconjunctivitis. *Can J Ophthalmol.* 2006;41:693–698.
6. Tomida I, Schlote T, Bräuning J, et al. Cyclosporin A 2% eyedrops in therapy of atopic and vernal keratoconjunctivitis [in German]. *Ophthalmologe.* 2002;99:761–767.
7. Avunduk AM, Avunduk MC, Erdöl H, et al. Cyclosporine effects on clinical findings and impression cytology specimens in severe vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmologica.* 2001;215:290–293.
8. Hingorani M, Moodaley L, Calder VL, et al. A randomized, placebo-controlled trial of topical cyclosporin A in steroid-dependent atopic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology.* 1998;105:1715–1720.
9. Ozcan AA, Ersoz TR, Dulger E. Management of severe allergic conjunctivitis with topical cyclosporin a 0.05% eyedrops. *Cornea.* 2007;26:1035–1038.
10. Akpek EK, Dart JK, Watson S, et al. A randomized trial of topical cyclosporin 0.05% in topical steroid-resistant atopic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology.* 2004;111:476–482.
11. Keklikci U, Soker SI, Sakalar YB, et al. Efficacy of topical cyclosporin A 0.05% in conjunctival impression cytology specimens and clinical findings of severe vernal keratoconjunctivitis in children. *Jpn J Ophthalmol.* 2008;52:357–362.
12. Tasaka K, Akagi M, Izushi K, et al. Antiallergic effect of epinastine: the elucidation of the mechanism. *Pharmacometrics.* 1990;39:365–373.
13. McGhee CN, Dean S, Danesh-Meyer H. Locally administered ocular corticosteroids: benefits and risks. *Drug Saf.* 2002;25:33–55.
14. Fukushima A, Yoshida H, Iwamoto H, et al. The role of cellular immunity both in the induction and effector phases of experimental allergic blepharoconjunctivitis (EAC) in rats. *Exp Eye Res.* 1997;65:631–637.
15. Yoshida O, Yoshida H, Iwamoto H, et al. Genetic background determines the nature of immune responses and experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis (EC). *Curr Eye Res.* 1999;18:117–124.
16. Bayer A, Uludağ HA, Sobaci G, et al. Comparison of antiallergic drugs in an experimental model of ocular anaphylaxis. *Ophthalmologica.* 2003;217:119–123.
17. Fukushima A, Ozaki A, Fukata K, et al. Ag-specific recognition, activation, and effector function of T cells in the conjunctiva with experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:4366–4374.
18. Whitcup SM, Chan CC, Luyo DA, et al. Topical cyclosporine inhibits mast cell-mediated conjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:2686–2693.
19. Thomson AW. The effects of cyclosporin A on non-T cell components of the immune system. *J Autoimmun.* 1992;5(suppl A):167–176.

20. Pfau B, Kruse FE, Rohrschneider K, et al. Comparison between local and systemic administration of cyclosporin a on the effective level in conjunctiva, aqueous humor and serum [in German]. *Ophthalmologe*. 1995;92:833–839.
21. Trocmé SD, Trocmé MC, Bloch KJ, et al. Topically induced ocular anaphylaxis in rats immunized with egg albumin. *Ophthalmic Res*. 1986;18:68–74.
22. Calonge MC, Pastor JC, Herreras JM, et al. Pharmacologic modulation of vascular permeability in ocular allergy in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990;31:176–180.
23. Brown JM, Wilson TM, Metcalfe DD. The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:4–18.
24. Leonardi A. The central role of conjunctival mast cells in the pathogenesis of ocular allergy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2002;2:325–331.
25. Nagata T, Nabe T, Fujii M, et al. Effects of multiple dexamethasone treatments on aggravation of allergic conjunctivitis associated with mast cell hyperplasia. *Biol Pharm Bull*. 2008;31:464–468.
26. Macleod JD, Anderson DF, Baddeley SM, et al. Immunolocalization of cytokines to mast cells in normal and allergic conjunctiva. *Clin Exp Allergy*. 1997;27:1328–1334.
27. el-Asrar AM, Tabbara KF, Geboes K, et al. An immunohistochemical study of topical cyclosporine in vernal keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol*. 1996;121:156–161.
28. Hingorani M, Calder VL, Buckley RJ, et al. The immunomodulatory effect of topical cyclosporin A in atopic keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:392–399.
29. Strong B, Farley W, Stern ME, et al. Topical cyclosporine inhibits conjunctival epithelial apoptosis in experimental murine keratoconjunctivitis sicca. *Cornea*. 2005;24:80–85.
30. Sherif Z. Corticosteroids in ophthalmology: past–present–future. *Ophthalmologica*. 2002;216:305–315.
31. Shii D, Oda T, Shinomiya K, et al. Cyclosporine A eye drops inhibit the early-phase reaction in a type-I allergic conjunctivitis model in mice. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2009;25:321–328.