

局部用依匹斯汀和奥洛他定滴眼液对小鼠泪液量的影响

原文标题: Effect of Topical Ophthalmic Epinastine and Olopatadine on Tear Volume in Mice
Eye & Contact Lens 2006; 32(6): 272–276 · Arturo L. Villareal, M.D.; William Farley, M.S.;
Stephen C. Pflugfelder, M.D. (美国贝勒医学院眼科眼表中心, 休斯敦)

摘要

目的: 利用小鼠模型研究局部用依匹斯汀和奥洛他定对泪液量的影响。方法: 85 只 C57BL6 小鼠 (170 眼) 每日 2 次分别接受局部依匹斯汀 0.05%、奥洛他定 0.1%、阿托品 1% 滴眼液治疗, 或作为未处理对照。采用棉线湿润试验在基线以及第 2 天和第 4 天末次滴药后 15、45、90、120 和 240 分钟测量泪液量。结果: 治疗 2 天后, 依匹斯汀处理小鼠在 15、45、90 和 240 分钟的平均泪液量均高于奥洛他定处理小鼠, 其中 15 和 45 分钟时差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。奥洛他定在 15 和 45 分钟时较未处理对照显著减少泪液量 ($P < 0.001$)。4 天后, 依匹斯汀治疗的泪液量在所有时间点均超过奥洛他定治疗, 45 分钟时差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。阿托品使泪液在 15、45 和 90 分钟时无法检出; 240 分钟时泪液量恢复至基线水平。结论: 局部依匹斯汀不抑制泪液分泌, 而奥洛他定引起泪液量显著减少。由于依匹斯汀对泪腺功能单位的影响为中性, 对于干眼症患者或有干眼发生风险的过敏性结膜炎患者, 依匹斯汀可能是特别合适的治疗选择。

关键词: 过敏性结膜炎 — 干眼症 — 依匹斯汀 — 眼表干燥 — 奥洛他定 — 泪液量。

引言

干眼症是一种常见疾病, 在美国影响多达 430 万人, [1] 是一种不稳定的泪膜无法充分维持眼表上皮健康的综合征。[2] 正常泪膜的完整性和成分由泪腺功能单位维持, 该功能单位由眼表 (角膜、结膜、副泪腺和睑板腺)、主泪腺以及相互连接的神经支配组成。神经反馈环路保证正常的泪液生成和眼表稳态。[3] 该功能单位任何组成部分受损都会破坏泪膜稳定, 并启动一系列炎症事件, 导致泪液成分改变以及眼表和泪腺炎症。泪腺功能单位受损的后果包括泪液量减少、不适症状, 以及眼表对生物性和环境性损伤的易感性增加。[2,4]

干眼的危险因素 (如年龄、绝经后状态、长时间使用电脑以及准分子激光原位角膜磨镶术 LASIK) 可以多因素方式相互作用, 使轻度受损的泪腺功能单位转变为完全炎症性、有症状的状态; 因此, 高危患者避免可能改变眼表稳态的行为十分重要。长期使用治疗干眼以外疾病的局部眼科药物是一个未被充分重视的眼表损伤来源。例如, 常用青光眼药物已被证明会引起剂量依赖性的角膜损伤和结膜细胞浸润, 这很可能与所用防腐剂有关。[5]

过敏性结膜炎的药物治疗是一类已知具有眼部干燥特性、且在长达数周的过敏季节中被大量患者人群长期使用的药物。超过 3500 万美国人罹患季节性鼻结膜炎, [6] 每年开具的局部眼科治疗处方达 560 万张。[6a] 常用的第二代口服药物 (如氯雷他定和盐酸西替利嗪) 已被证明会诱发眼部干燥的体征和症状, 包括角膜和结膜染色增加、泪膜破裂时间缩短以及眼部不适, [7] 而第一代抗组胺药的干燥特性更是众所周知。[8] 虽然治疗过敏性结膜炎的局部药物副作用较口服药物少, [9] 但仍观察到了眼部干燥。例如, 在一项局部奥洛他定 0.1% 的 10 周环境试验 ($N = 131$) 中, 眼干是最常见的治疗相关不良事件 (奥洛他定治疗患者中为 3.1% [65 例中 2 例], 安慰剂组为 0%)。[10] 在一项奥洛他定 0.2% 的 12 周试验 ($N = 240$) 中, 至少有 1 例患者因眼干症状而停药。[11]

局部过敏性结膜炎治疗药物的眼部干燥效应尚未得到系统研究。本研究评估依匹斯汀 (一种对组胺 H2 受体也有亲和力的组胺 H1 拮抗剂) [12] 和奥洛他定 (一种 H1 抗组胺药) [13] 对健康小鼠泪液量的影响。小鼠模型系统已被证明能有效评估实验性诱导的干眼, [14] 并能在受控条件下测量泪液量和泪液渗透压。[15] 本研究还纳入了阿托品——一种强效的毒蕈碱胆碱能受体拮抗剂[16]——作为诱发眼部干燥的阳性对照。

材料与方法

实验系统与干预

本研究使用 4–6 周龄的 C57BL6 小鼠（Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME），雌雄比例为 1:1。所有研究均按照视觉与眼科学研究协会（ARVO）《眼科和视觉研究中动物使用声明》进行，所有动物研究方案均经贝勒医学院比较医学中心批准。

小鼠被随机分配接受以下治疗之一：依匹斯汀 0.05% 滴眼液（Elestat, Inspire Pharmaceuticals, Durham, NC）、奥洛他定 0.1%（Patanol, Alcon Laboratories, Fort Worth, TX）、阿托品 1%（Falcon Pharmaceuticals, Fort Worth, TX）或不处理。共进行 3 轮实验（表1）。每轮实验中，依匹斯汀组、奥洛他定组和阿托品组的小鼠在轻轻分开眼睑后，用微量移液器吸头向每眼滴入 1 μ L 相应药物，每日 2 次。滴药后保持眼睑张开 10 秒，使研究药物分散。

双眼泪液量在治疗开始前（基线）以及所有实验轮次的第 2 天、仅 C 轮的第 4 天进行评估。第 2 天的评估在未次滴入研究药物后 15、45、90、120 和 240 分钟进行。第 4 天的测量在滴药后 15、45、90 和 240 分钟进行。未处理对照小鼠的测量时间点与药物处理小鼠相同。

表1 每轮实验的眼数。注：a 小鼠只数 = 眼数/2。每轮实验按方法部分所述，在第 2 天和第 4 天的基线及 15、45、90、120 和 240 分钟评估泪液量。b 90 分钟未评估。c 240 分钟未评估。d 120 分钟未评估。

治疗组	A 轮	B 轮	C 轮	合计
未处理	20 b,c	20	—	40
依匹斯汀	20 b,c	20 b	20 d	60
奥洛他定	20 b	20 b	20 d	60
阿托品	—	—	10 d	10
合计	60	60	50	170

泪液量测定

采用棉线试验[15] 测量泪液量。研究者将酚红浸渍棉线（ZONE-QUICK, Menicon America, Inc., San Mateo, CA）置于外眦泪河处 20 秒。当弱碱性的泪液被吸入棉线时，pH 敏感的酚红染料由黄色变为淡红色。用镊子标记颜色变化的界限（图1）定位后，用 Nikon SMZ1500 显微镜（Nikon Instruments, Inc., Melville, NY）以 1 $\times$ 放大倍数拍摄棉线，测量棉线上泪液湿润（红色着色）的距离。成像软件（MetaVue Imaging System, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA）随后沿棉线着色路径绘制曲线并以毫米为单位确定湿润距离。

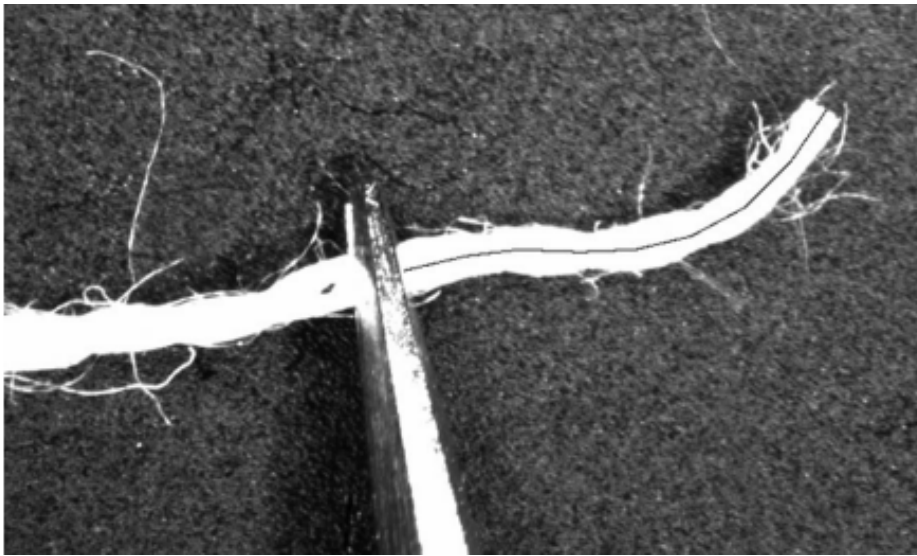


图1 测量泪液量的酚红棉线试验。弱碱性的泪液与浸渍在棉线中的 pH 指示染料反应使其变红。实线标记的红色区域长度对应于从眼表虹吸上来的泪液所湿润的区域。因此，该棉线试验在概念上与 Schirmer 试验相似。

为将距离换算为泪液量，绘制了标准曲线。用校准的玻璃微量移液管将已知体积的对照贮备液（1,500 μL 的 0.9% 生理盐水和 5 μL 的 5N NaOH）滴加在一系列棉线上，各静置 20 秒。对照体积范围在小鼠泪液的预期范围内。测量吸收距离，并使用 Excel 软件（Microsoft Corp., Redmond, WA）将其对已知体积作图，绘制标准曲线（ $R^2 = 0.996$ ）（图2）。该标准曲线用于将小鼠泪液吸收距离换算为泪液量。所有泪液量均以平均值 $\pm$ 均值标准误表示。

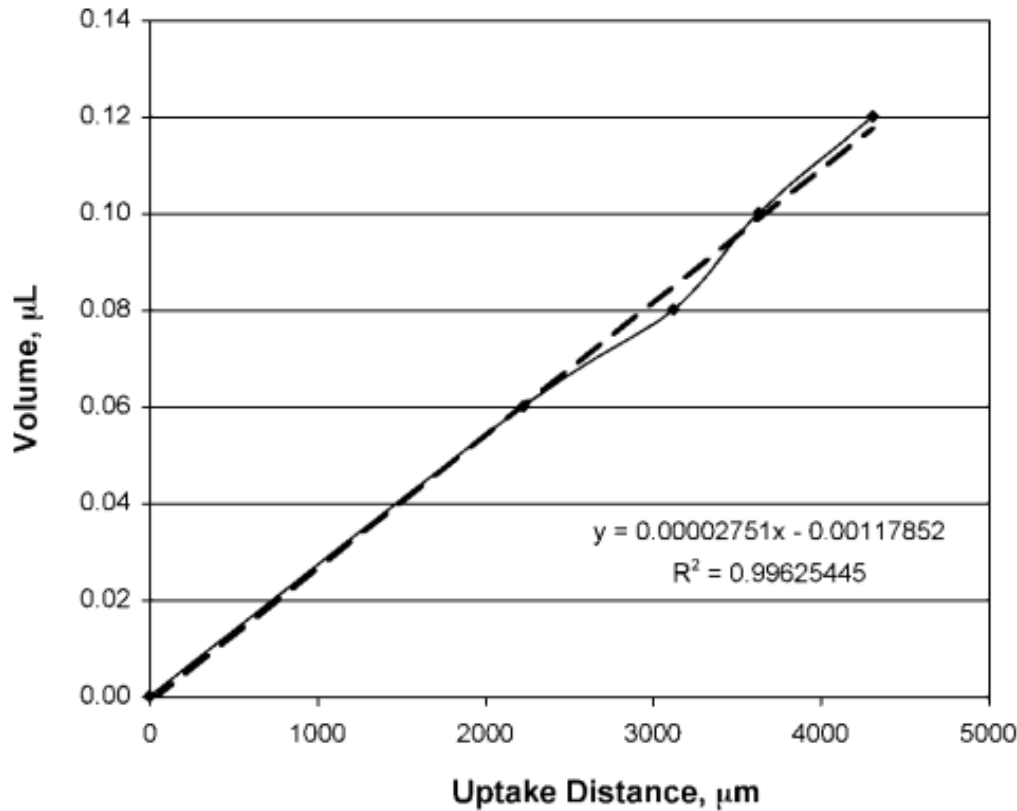


图2 酚红浸渍棉线吸收的标准曲线。用若干已知体积的对照液进行棉线试验，将所得吸收距离对体积作图。该曲线随后用于将实际小鼠泪液吸收距离换算为泪液量（菱形：实测吸收距离；虚线：回归线）。

统计学方法

各治疗组的平均泪液量以时间和处理为因素，采用双因素重复测量方差分析，使用 GraphPad Prism 软件（GraphPad, Inc., San Diego, CA）进行统计分析。采用 Bonferroni 多重比较事后检验检测各时间点的组间差异。P 值小于 0.05 认为有统计学意义。

结果

治疗 2 天后的泪液量

未处理对照眼（ $n = 40$ ）以及依匹斯汀（ $n = 60$ ）或奥洛他定（ $n = 60$ ）处理 2 天的眼的泪液量（平均值 $\pm$ 均值标准误）见图3。治疗开始前测得的基线泪液量各组间无显著差异。在以第 2 天末次滴药开始的 240 分钟时程中，双因素重复测量方差分析发现时间和药物处理对测得泪液量均有显著影响（两者均 $P < 0.0001$ ）。

滴药后 15、45、90 和 240 分钟，依匹斯汀处理眼的平均泪液量高于奥洛他定处理眼，15 和 45 分钟时泪液量差异有统计学意义（ $P < 0.001$ ）（图3）。依匹斯汀处理眼的平均泪液量在所有时间点均与未处理眼无统计学差异，唯 45 分钟时显著高于未处理眼（ $P < 0.001$ ）。依匹斯汀处理眼在基线及 15、45、

90、120 和 240 分钟测得的平均泪液量分别为 $0.072 \pm 0.006 \mu\text{L}$ 、 $0.054 \pm 0.004 \mu\text{L}$ 、 $0.069 \pm 0.004 \mu\text{L}$ 、 $0.059 \pm 0.007 \mu\text{L}$ 、 $0.066 \pm 0.005 \mu\text{L}$ 和 $0.076 \pm 0.006 \mu\text{L}$ 。

与依匹斯汀的结果相反，奥洛他定在多项比较中降低了泪液量（图3）。除前述在 15 和 45 分钟时劣于依匹斯汀外，奥洛他定处理眼在 15 和 45 分钟的平均泪液量也显著低于未处理眼（ $P < 0.001$ ）。奥洛他定在 90 分钟时的平均泪液量也低于未处理眼，但差异无统计学意义。奥洛他定处理眼在基线及 15、45、90、120 和 240 分钟的平均泪液量分别为 $0.062 \pm 0.004 \mu\text{L}$ 、 $0.042 \pm 0.003 \mu\text{L}$ 、 $0.045 \pm 0.004 \mu\text{L}$ 、 $0.043 \pm 0.007 \mu\text{L}$ 、 $0.069 \pm 0.006 \mu\text{L}$ 和 $0.065 \pm 0.004 \mu\text{L}$ 。

未处理眼在基线及 15、45、90、120 和 240 分钟测得的平均泪液量分别为 $0.063 \pm 0.006 \mu\text{L}$ 、 $0.056 \pm 0.005 \mu\text{L}$ 、 $0.062 \pm 0.006 \mu\text{L}$ 、 $0.057 \pm 0.005 \mu\text{L}$ 、 $0.062 \pm 0.007 \mu\text{L}$ 和 $0.063 \pm 0.009 \mu\text{L}$ 。

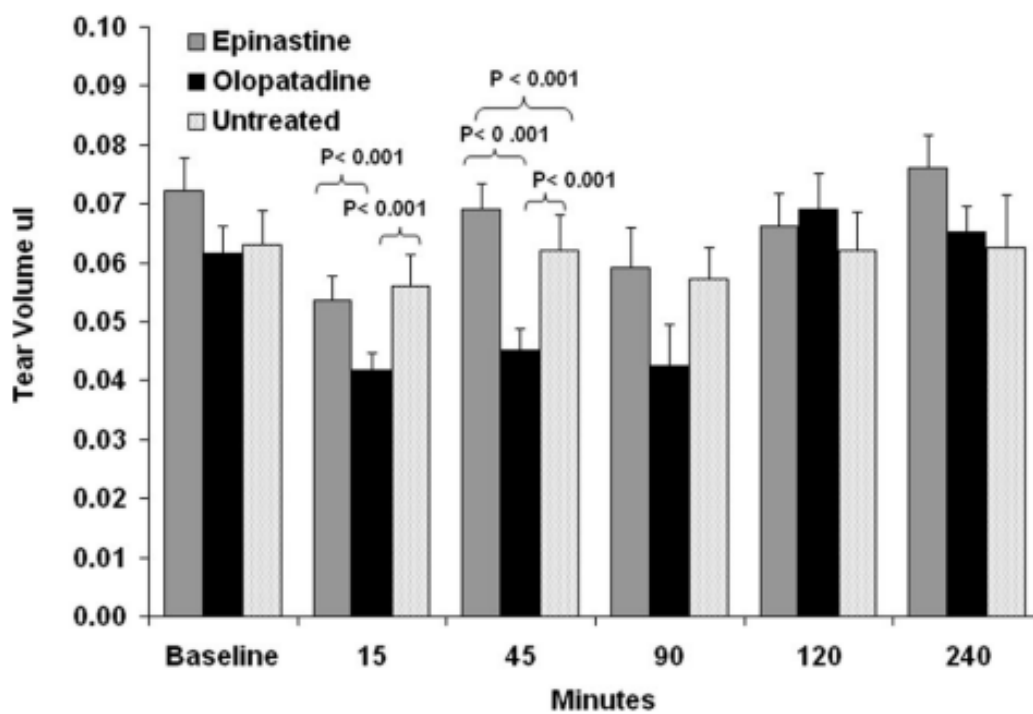


图3 每日 2 次依匹斯汀或奥洛他定治疗 2 天后测得的小鼠泪液量。A、B、C 三轮实验的合并数据以平均值 ± 均值标准误作图（依匹斯汀， $n = 60$ 眼；奥洛他定， $n = 60$ 眼；未处理对照， $n = 40$ 眼）。

治疗 4 天后的泪液量

依匹斯汀（ $n = 20$ ）、奥洛他定（ $n = 20$ ）或阿托品（ $n = 10$ ）处理 4 天的眼的平均泪液量见图4。结果与第 2 天数据基本一致，时间和药物处理对测得泪液量均有显著影响（两者均 $P < 0.0001$ ）。治疗开始前获得的依匹斯汀组、奥洛他定组和阿托品组基线值组间无显著差异。依匹斯汀处理眼的平均泪液量在每个时间点均超过奥洛他定处理眼，45 分钟时依匹斯汀具有统计学优势（ $P < 0.05$ ）。依匹斯汀组的平均泪液量随时间呈上升趋势，而奥洛他定组的泪液量保持稳定或略有下降；但依匹斯汀组和奥洛他定组均未检出统计学显著的组内差异。依匹斯汀组在基线及 15、45、90 和 240 分钟测得的平均泪液量分别为 $0.041 \pm 0.004 \mu\text{L}$ 、 $0.046 \pm 0.006 \mu\text{L}$ 、 $0.049 \pm 0.004 \mu\text{L}$ 、 $0.048 \pm 0.005 \mu\text{L}$ 和 $0.054 \pm 0.007 \mu\text{L}$ 。奥洛他定在同一系列时间点的平均泪液量分别为 $0.039 \pm 0.004 \mu\text{L}$ 、 $0.035 \pm 0.005 \mu\text{L}$ 、 $0.033 \pm 0.004 \mu\text{L}$ 、 $0.035 \pm 0.005 \mu\text{L}$ 和 $0.041 \pm 0.005 \mu\text{L}$ 。

阿托品组作为抗胆碱能阳性对照纳入本研究（基线值 $0.034 \pm 0.006 \mu\text{L}$ ）。与依匹斯汀和奥洛他定处理眼不同，阿托品处理眼在 15、45 和 90 分钟时泪液无法检出（ $P < 0.001$ vs 依匹斯汀和奥洛他定），240 分钟时泪液量（ $0.048 \pm 0.013 \mu\text{L}$ ）恢复至基线水平（图4）。

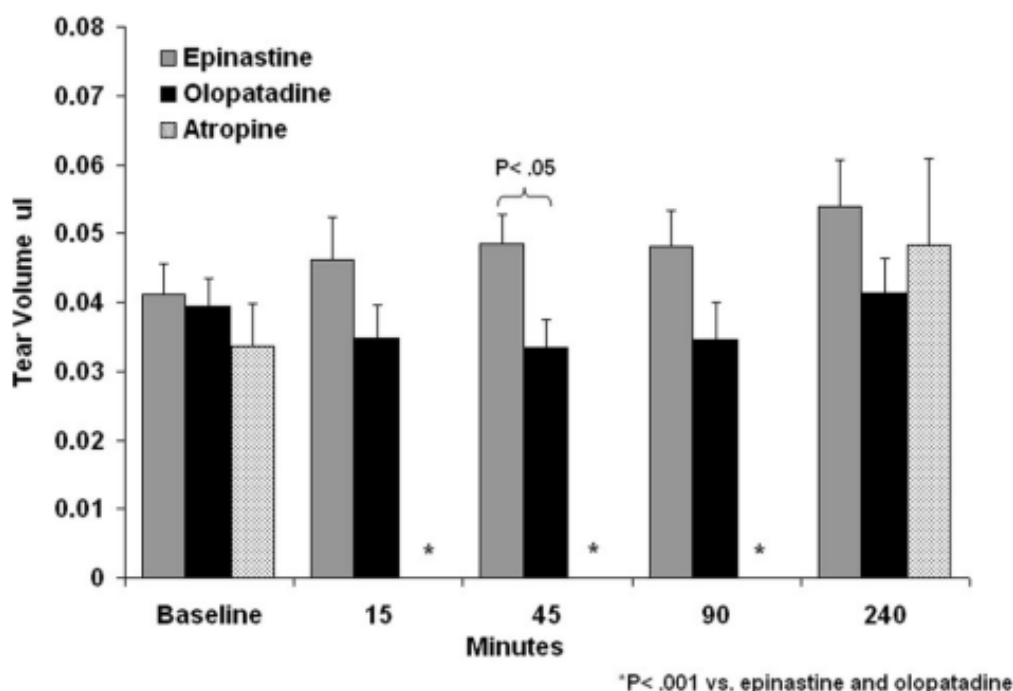


图4 每日2次依匹斯汀、奥洛他定或阿托品治疗4天后测得的小鼠泪液量。A轮实验数据以平均值 ± 均值标准误差作图（依匹斯汀，n = 20眼；奥洛他定，n = 20眼；阿托品，n = 10眼）。*P < 0.001 vs 依匹斯汀和奥洛他定。

讨论

在这项旨在评估局部依匹斯汀和奥洛他定对小鼠泪液量影响的研究中，依匹斯汀不抑制泪液分泌，而奥洛他定引起泪液量显著减少。

小鼠数据的多个方面支持关于依匹斯汀和奥洛他定对泪液量相对影响的结论。第2天，依匹斯汀处理眼在15、45、90和240分钟的平均泪液量高于奥洛他定处理眼，15和45分钟时差异有统计学意义。依匹斯汀组各时间点的平均泪液量与未处理对照眼在所有时间点均无统计学差异，唯45分钟时显著更高。相反，奥洛他定处理眼的平均泪液量在15、45和90分钟低于未处理眼，15和45分钟时达到组间统计学显著性。第4天也观察到类似结果：依匹斯汀处理眼的平均泪液量在每个时间点均超过奥洛他定，45分钟时差异有统计学意义。综合起来，这些观察有力地支持奥洛他定（而非依匹斯汀）对泪液分泌具有抑制作用。

阳性对照阿托品的结果验证了该模型。正如预期，阿托品在最早的时间点（15分钟）即完全消除了可测量的泪液量。泪液缺乏持续至45和90分钟。平均泪液量在240分钟恢复正常。既往也观察到了应用阿托品后泪液量恢复的现象。[17]值得注意的是，奥洛他定处理眼中观察到了类似但更轻微的模式。第2天和第4天，奥洛他定处理眼的平均泪液量在15、45和90分钟下降，但在较晚的时间点（120和240分钟）恢复至基线水平（图3和图4）。依匹斯汀处理眼中未见这种模式。因此，给予奥洛他定后观察到的泪液分泌时间模式与已知强效抗胆碱能药物阿托品的模式有相似之处。

当前结果的一个有趣之处是阿托品以及程度较轻的奥洛他定所表现出的反弹效应，即最初90分钟内泪液量的下降在较晚时间得到逆转。阿托品被认为通过阻断毒蕈碱受体诱发眼部干燥。[16]这些受体分布于整个泪腺功能单位，尤其是泪腺和结膜杯状细胞。[18,19]毒蕈碱受体和其他受体的神经刺激对正常泪膜中电解质、液体和蛋白质的分泌可能十分重要。[18–20]作者推测，本研究中观察到的反弹效应可能代表随着药物从胆碱能受体解离或新受体整合入细胞膜，毒蕈碱受体抑制发生逆转。

本研究有若干局限性。首先，在小鼠中测量泪液量存在潜在的技术挑战。然而，当前结果被认为是可信的，因为第2天和第4天的依匹斯汀和奥洛他定结果具有内部一致性和统计学显著性，因为阿托品阳性对照的表现符合预期，也因为本研究测得的泪液量范围与既往研究测得的健康C57BL/6小鼠基线平均泪液

量 ($0.066 \pm 0.023 \mu\text{L}$) 相近。[15] 还应强调的是, 这是一项动物研究, 结果可能不能直接推广至人类。然而, 实验性诱导干眼的小鼠已被证明具有与人类干眼症相似的泪腺功能单位反应以及角膜和结膜表现。[14] 本研究未探讨依匹斯汀和奥洛他定对泪液量产生不同影响的原因。有必要在这一领域开展进一步研究, 特别是关于可能涉及的分子机制。

总之, 本研究表明奥洛他定对泪液量有抑制作用, 而依匹斯汀似乎不减少泪液量。这在临床医生为过敏性结膜炎患者选择局部用药时可能具有临床意义。

许多患者在可持续数周的过敏季节中长期使用抗过敏药物, 并且常常不顾处方医生规定的给药方案, 按需使用这些药物缓解症状。鉴于此, 医生应考虑局部抗过敏治疗对眼表健康的影响, 尤其是对干眼症患者或有干眼发生风险者。这些人群包括老年患者、绝经后女性、LASIK 术后患者、高强度使用电脑者、长期使用其他局部眼科治疗(如青光眼药物)者, 或眼表存在任何损害者。基于对干眼症病理生理学的理解, 从眼表健康的角度来看, 像依匹斯汀这样对泪腺功能单位影响为中性的药物, 可能是治疗过敏性结膜炎优于奥洛他定 0.1% 或 0.2% 的选择。

参考文献

1. Schein OD, Munoz B, Tielsch JM, et al. Prevalence of dry eye among the elderly. *Am J Ophthalmol* 1997;124:723–728.
2. Pflugfelder SC. Dry eye: The problem. In: Pflugfelder SC, Beuerman RW, Stern ME, eds. *Dry Eye and Ocular Surface Disorders*. New York, Marcel Dekker, 2004, pp 1–10.
3. Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, et al. The pathology of dry eye: The interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea* 1998;17:584–589.
4. Stern ME, Gao J, Siemasko KF, et al. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res* 2004;78:409–416.
5. Noecker RJ, Herrygers LA, Anwaruddin R. Corneal and conjunctival changes caused by commonly used glaucoma medications. *Cornea* 2004;23:490–496.
6. Nathan RA, Meltzer EO, Selner JC, Storms W. Prevalence of allergic rhinitis in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:S808–814.
- 6a. IMS Health Inc. Retail Drug Monitor. Available at <http://www.imshealth.com>. Accessed August 2005 [Added in Proof].
7. Ousler GW, Wilcox KA, Gupta B, et al. An evaluation of the ocular drying effects of 2 systemic antihistamines: loratadine and cetirizine hydrochloride. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;93:460–464.
8. Simons FER. Advances in H1-antihistamines. *N Engl J Med* 2004;351:2203–2217.
9. Bielory L, Lien KW, Bigelson S. Efficacy and tolerability of newer antihistamines in the treatment of allergic conjunctivitis. *Drugs* 2005;65:215–228.
10. Abelson MB, Turner D. A randomized, double-blind, parallel-group comparison of olopatadine 0.1% ophthalmic solution versus placebo for controlling the signs and symptoms of seasonal allergic conjunctivitis and rhinoconjunctivitis. *Clin Ther* 2003;25:931–947.
11. Abelson MB, Gomes PJ, Vogelsson CT, et al. Effects of a new formulation of olopatadine ophthalmic solution on nasal symptoms relative to placebo in two studies involving subjects with allergic conjunctivitis or rhinoconjunctivitis. *Curr Med Res Opin* 2005;21:683–691.

12. Fugner A, Bechtel WD, Kuhn FJ, et al. In vitro and in vivo studies of the non-sedating antihistamine epinastine. *Arzneimittelforschung* 1988;38:1446–1453.
13. Sharif NA, Xu SX, Yanni JM. Olopatadine (AL-4943A): Ligand binding and functional studies on a novel, long acting H₁-selective histamine antagonist and anti-allergic agent for use in allergic conjunctivitis. *J Ocular Pharmacol Ther* 1996;12:401–407.
14. Dursun D, Wang M, Monroy D, et al. A mouse model of keratoconjunctivitis sicca. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:632–638.
15. Stewart P, Chen Z, Farley W, et al. Effect of experimental dry eye on tear sodium concentration in the mouse. *Eye Contact Lens* 2005;31:175–178.
16. Pappano AJ, Katzung BG. Cholinceptor-blocking drugs. In: Katzung BG, ed. *Basic and Clinical Pharmacology*, 8th ed. New York, McGraw-Hill, 2001, pp 107–119.
17. Hollingsworth SR, Canton DD, Buyukmihci NC, et al. Effects of topically administered atropine on tear productions in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1992;200:1481–1484.
18. Beuerman RW, Mircheff A, Pflugfelder SC, et al. The lacrimal functional unit. In: Pflugfelder SC, Beuerman RW, Stern ME, eds. *Dry Eye and Ocular Surface Disorders*. New York, Marcel Dekker, 2004, pp 11–39.
19. Salamanca AE, Siemasko KF, Diebold Y, et al. Expression of muscarinic and adrenergic receptors in normal human conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:504–513.
20. Dartt DA. Regulation of mucin and fluid secretion by conjunctival epithelial cells. *Prog Retinal Eye Res* 2002;21:555–576.