

环胞苷抗单纯疱疹病毒的实验

河南省眼科研究所药物室

(郑州)

抗单纯疱疹病毒的化学治疗,近年来已有很大进展。继碘苷后又从嘧啶和嘌呤核苷中找到了一些新药,具有一定的治疗价值。特别在眼科对浅层型单纯疱疹角膜炎显示了显著的疗效,但对实质层型单纯疱疹角膜炎的治疗仍感棘手。继续寻找对此型有效的新药,仍是目前的迫切任务。

阿糖胞苷 (Cytosine Arabinoside) 虽具有较强的抗单纯疱疹病毒的作用,但由于其细胞毒性大,限制了它在临床的推广应用。本文报道阿糖胞苷的环化衍生物——环胞苷 (Cyclocytidine) 在组织培养系统和兔试验性单纯疱疹角膜炎中的抗单纯疱疹病毒作用。

材料和方法

(一) 药物和病毒的来源

环胞苷和阿糖胞苷为上海十二药厂生产的无菌注射用粉剂。

病毒为中国医学科学院流行病防治研究所提供的单纯疱疹病毒 1 型。

(二) 组织培养

用原代乳兔肾细胞,待长成单层后进行实验。以单纯疱疹病毒所致的特异性细胞病变作为观察药物作用的指标,如药物和病毒同时在细胞管连续培养 7 天,不出现细胞病变,则判断为具有抑毒作用。

(三) 兔眼实验性单纯疱疹角膜炎

选取健康、角膜无损伤的家兔,按 Pavan-Langston 等法制造实验性单纯疱疹角膜炎模型^[1,2]。将已感染的家兔分成两组:一组 4 只兔 8 只眼,于感染后 4 小时用 0.05% 环胞苷溶液滴眼,每小时一次,每次二滴,每天共 10 次,于傍晚最后一次点 0.05% 环胞苷眼膏;另一组 4 只兔 8 只眼用生理盐水滴眼,同上法处理,作为对照组。共治疗 10 天,停药后再观察 10 天。于开始治疗后的第 3、7、10、14 天用荧光素染色观察角膜病变,以裂隙灯观察角膜炎的侵犯部位。

结 果

(一) 组织培养

1. 环胞苷和阿糖胞苷的细胞毒性:

取已长成单层、形态良好的细胞管,弃去营养液,每管加 0.9 毫升维持液和各种不同浓度的药液 0.1 毫升,37℃ 静置培养,72 小时后观察细胞形态,评价药物对细胞的毒性。结果表明环胞苷的最大细胞耐受浓度为 500 微克/毫升,阿糖胞苷为 10 微克/毫升。

2. 药物浓度与抗病毒作用的关系:

将环胞苷和阿糖胞苷的各个不同稀释浓度分别与 10^3 TCD₅₀ 病毒液同时接种于细胞管,37℃ 培养 7 天。结果指出环胞苷的最低抑毒浓度为 10 微克/毫升,阿糖胞苷为 1 微克/毫升。

3. 病毒感染量与药物作用的关系:

以不同感染量病毒液 (10^1 — 10^5 TCD₅₀) 与一定浓度药物同时接种入细胞管,37℃ 培养 7 天,结果列于表 1。实验证明,环胞苷 100 微克/毫升,阿糖胞苷 1 微克/毫升,具有明显的抑毒作用。环胞苷 10 微克/毫升,对高感染量病毒 (10^5 TCD₅₀) 无抑制作用。进一步降低浓度,环胞苷 1 微克/毫升、阿糖胞苷 0.1 微克/毫升,仅对 10^1 和 10^2 TCD₅₀ 病毒有抑制作用。

4. 病毒感染时间与药物作用关系:

用 10^3 TCD₅₀ 病毒液分别接种于细胞管,37℃ 培养,于 4、8、12、或 24 小时后取出,洗去病毒液,再分别加入含环胞苷 (10 微克/毫升) 或阿糖胞苷 (1 微克/毫升) 的维持液,37℃ 培养 7 天。结果表明,上述两种药物对预先接种感染 4、8、12 小时的病毒均具抑毒作用,但对感染 24 小时后的病毒,则两种药物皆无抑毒作用 (表 2)。说明药物只能在病毒生长繁殖的早期具抑毒作用。

5. 环胞苷的抗病毒作用强度:

本文于 1977 年 3 月 28 日收到。

表 1 病毒感染量与药物作用关系

病毒感染量 (TCD ₅₀)	环胞苷(微克/毫升)			阿糖胞苷(微克/毫升)	
	1	10	100	0.1	1
10 ⁵	—	—	+	—	+
10 ⁴	—	+	+	—	+
10 ³	—	+	+	—	+
10 ²	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+

注: “+”有抑毒作用; “—”无抑毒作用。

表 2 病毒感染时间与药物作用的关系

化 合 物		病毒感染量 TCD ₅₀	抑 毒 作 用			
名 称	浓度(微克/毫升)		4 小时	8 小时	12 小时	24 小时
环胞苷	10	10 ³	+	+	+	—
阿糖胞苷	1	10 ³	+	+	+	—

表 3 环胞苷的抗病毒作用强度

药物浓度 (微克/毫升)	病毒感染量 TCD ₅₀	病毒滴度(TCD ₅₀ 的对数值)		抑制对数
		实验组	对照组	
100	10 ⁵	—	7.00±0.38	完全抑制
	10 ⁴	—	6.50±0.44	
	10 ³	—	6.00±0.38	
	10 ²	—	6.00±0.38	
	10	—	5.77±0.48	
10	10 ⁵	6.33±0.37	7.00±0.38	0.67(P>0.05)
	10 ⁴	3.23±0.46	6.50±0.44	3.27(P<0.01)
	10 ³	2.24±0.44	6.00±0.38	3.76(P<0.01)
	10 ²	—	6.00±0.38	完全抑制
	10	—	5.77±0.48	
1	10 ⁵	7.08±0.44	7.00±0.38	无抑制作用
	10 ⁴	6.64±0.42	6.50±0.44	
	10 ³	5.52±0.41	6.00±0.38	
	10 ²	2.83±0.38	6.00±0.38	
	10	2.67±0.36	5.77±0.48	

将三种浓度的环胞苷与不同感染量病毒同时接种于细胞管, 37℃ 培养 72 小时后取出置于一40℃低温冰箱, 反复冻融三次, 滴定病毒滴度与对照组比较观察环胞苷的抑毒效价。实验表明环胞苷的抑毒作用随药液浓度的加大而增强, 随病毒感染量的增加而减弱(表 3)。

(二) 兔眼实验性单纯疱疹角膜炎

兔眼感染单纯疱疹病毒后, 对照眼于 24 小时

在伤眼区呈现明显树枝状病变, 随后逐渐加重, 至 10—14 天大部分发展为盘状角膜炎。裂隙灯检查可见病变侵犯实质层, 角膜水肿, 后弹力层皱折, Kp(+), 房水闪辉(+), 虹膜充血, 造成深实质层型病变和单纯疱疹虹膜炎。其中有 3 只兔分别于感染病毒后的第 11、12、15 天死于脑炎; 治疗组用 0.05% 环胞苷溶液滴眼, 有 50% (4 只眼) 眼在治疗过程中未出现角膜病变, 另 4 只眼在治疗

后第3天检查呈现典型树枝状角膜炎,继续滴眼于第7天角膜病变消退,第10天痊愈。随即停药,继续观察至14天,其中1只兔的右眼角膜病变复发,呈地图状角膜炎,并于第16天死亡。另3只兔6只眼未复发。上述结果显示环胞苷对实验性单纯疱疹角膜炎具有预防和治疗作用。

讨 论

自1961年证明碘苷的抗病毒作用,随即应用于临床以来,嘧啶类核苷衍生物的抗病毒作用引起了人们的广泛注意。现已证明卤化嘧啶类核苷和阿拉伯糖嘧啶类核苷两大类衍生物,无论在体内和体外实验中均有不同程度的抗病毒作用。其中卤化衍生物特别是碘苷已广泛用于眼科临床,治疗浅层单纯疱疹角膜炎,疗效确实,刺激性小,成为常用药物之一。但其缺点是溶解度小、热稳定性差,并且随着应用的日趋广泛,临床上对碘苷耐药的毒株亦不断出现,特别是对深层单纯疱疹角膜炎无效,因而临床使用受到一定限制。

阿糖胞苷的抗病毒作用早在体内、外实验中肯定。与碘苷相比具有作用强、溶解度大、对热稳定和不易产生耐药株的优点,但对细胞毒性大,常用浓度对人和动物二者的角膜均造成广泛创伤,初呈角膜上皮下的弥漫性点状薄雾,继之广泛点状着色,严重者发展为角膜溃疡。因此,限制了它在眼科临床的推广使用^[3-6]。

环胞苷是阿糖胞苷的环状衍生物,化学名为

Z, 2'-脱水-1- β -D-呋喃阿糖胞嘧啶(Z, 2'-Anhydro-1- β -D-arabinofuranosylcytosine)。在动物肿瘤实验中,与阿糖胞苷相比有毒性小、疗效高,因而安全系数较大的优点。其抗病毒作用尚未见有报道,我们在组织培养系统中,对阿糖胞苷和环胞苷的抗单纯疱疹病毒作用进行了比较观察。结果表明环胞苷的细胞毒性较阿糖胞苷小50倍,抗病毒作用较阿糖胞苷约小10倍,因而治疗指数大于阿糖胞苷。兔眼实验性单纯疱疹角膜炎的初步观察表明环胞苷具有预防和治疗作用,且未发现明显的角膜毒性。在临床试用中,0.05%环胞苷溶液滴眼对浅层及深层单纯疱疹角膜炎均有明显疗效,为单纯疱疹角膜炎特别是实质层型病例的治疗提供了新的手段^[7]。

参 考 资 料

- [1] Pavan-Langston, D. et al.: *Arch. Ophthalm.*, 92:417, 1974.
- [2] Gerstein, D. D. et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7:285, 1975.
- [3] Gerald, E. U.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111:660, 1962.
- [4] Buthala, D. A.: *ibid.*, 115:69, 1964.
- [5] Kaufman, H. E. et al.: *Arch. Ophthalm.*, 69:626, 1963.
- [6] Kaufman, H. E. et al.: *ibid.*, 72:535, 1964.
- [7] 河南省眼科研究所: 中华医学杂志, 57: 500, 1977.