

# 三种常用非甾体类抗炎滴眼液对人角膜上皮细胞的毒性研究

曲明俐 段豪云 王瑶 王茜 周庆军

**【摘要】** 背景 双氯芬酸钠滴眼液、普拉洛芬滴眼液和溴芬酸钠滴眼液是眼科临床常用的非甾体类抗炎药(NSAIDs),长期应用可致人角膜上皮细胞(HCECs)的损伤,但3种滴眼液导致HCECs的损伤程度及滴眼液中添加物的细胞毒性尚不清楚。目的 评价双氯芬酸钠滴眼液、普拉洛芬滴眼液和溴芬酸钠滴眼液及其相应原料药对HCECs的毒性,明确其细胞毒性的主要来源。方法 常规培养HCECs,分别在培养液中添加1:1、1:2、1:5、1:10稀释的滴眼液或原料药,使最终质量分数分别为0.10%、0.05%、0.02%和0.01%。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测各组药物处理后HCECs的增生率;3种滴眼液均稀释至质量浓度0.002%(1:50),以Transwell法检测各组药物处理后HCECs迁移率;采用乳酸脱氢酶(LDH)检测法测定各组药物处理后HCECs损伤程度。结果 3种滴眼液对HCECs的毒性作用具有剂量依赖性,差异均有统计学意义(均 $P=0.00$ ),其中双氯芬酸钠滴眼液对HCECs增生、迁移和损伤影响最大,溴芬酸钠滴眼液对HCECs损伤程度最小,差异均有统计学意义(增生: $F_{\text{药物}}=20.25, P=0.00$ ;迁移: $F=103.43, P=0.00$ ;损伤: $F_{\text{药物}}=164.16, P=0.00$ )。与滴眼液相比,原料药的细胞毒性作用普遍较小,其中普拉洛芬原料药对HCECs增生、迁移和损伤影响最小,差异均有统计学意义(增生: $F_{\text{药物}}=332.27, P=0.00$ ;迁移: $F=23.02, P=0.00$ ;损伤: $F_{\text{药物}}=154.83, P=0.00$ )。结论 双氯芬酸钠滴眼液、普拉洛芬滴眼液和溴芬酸钠滴眼液中以双氯芬酸钠对角膜上皮的毒性作用最大;3种药物的细胞毒性来源是添加物本身或原料药与添加物综合作用的结果。

**【关键词】** 非甾体抗炎滴眼液;细胞毒性;原料药;添加物

## Cytotoxicity research of three non-steroidal anti-inflammatory eye drops in human corneal epithelial cells

Qu Mingli, Duan Haoyun, Wang Yao, Wang Qian, Zhou Qingjun. Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, China

Corresponding author: Zhou Qingjun, Email: qjzhou2000@hotmail.com

**【Abstract】** **Background** Diclofenac sodium eye drops, pranoprofen eye drops and bromfenac sodium hydrate eye drops are three clinical commonly used nonsteroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs). The variation of cytotoxicity among these drugs and whether the cytotoxicity is related to the supplements are also unknown. **Objective** This study was to compare the cytotoxicity of three non-steroidal anti-inflammatory eye drops and their active components with cultured human corneal epithelial cells (HCECs) *in vitro*, and to discuss toxic origins of these drugs. **Methods** HCECs were cultured in different drugs with the final concentration of 0.10%, 0.05%, 0.02% and 0.01%. Cell proliferation was evaluated by MTT assay. Then, 0.002% eye drops (1:50) was added, and the migration and damage of the cells were detected by transwell migration assay and lactate dehydrogenase (LDH) assay. **Results** The cytotoxicity of three nonsteroidal anti-inflammatory eye drops on HCECs was concentration-dependent (all at  $P=0.00$ ). Diclofenac sodium eye drops showed the most dominant effects on the proliferation, migration and damage of HCECs among the three eye drops, while bromfenac sodium eye drops showed the least effect on the cell damage (proliferation:  $F_{\text{drug}}=20.25, P=0.00$ ; migration:  $F=103.43, P=0.00$ ; damage:  $F_{\text{drug}}=164.16, P=0.00$ ). Compared with the eye drops, their active components showed less cytotoxicity. Pranoprofen appeared the least effects on the proliferation, migration and damage of HCECs (proliferation:  $F_{\text{drug}}=332.27, P=0.00$ ; migration:  $F=332.27, P=0.00$ ; damage:

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.07.012

作者单位:266071 青岛,山东省眼科研究所 山东省眼科学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地

通信作者:周庆军, Email: qjzhou2000@hotmail.com

$F_{drug} = 154.83, P = 0.00$ ). **Conclusions** The cytotoxicity of diclofenac sodium eye drops is more obvious than that of pranoprofen eye drops or bromfenac sodium hydrate eye drops. The cytotoxicity of the three eye drops originates from their supplements or the interaction between the supplements and active components.

[Key words] Non-steroidal anti-inflammatory eye drops; Cytotoxicity; Active components; Supplements

抗炎滴眼液是治疗眼表疾病及白内障和青光眼术后的常用药物,包括糖皮质激素和非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 2 类<sup>[1]</sup>。长期应用糖皮质激素滴眼液可导致角膜愈合能力下降、眼压升高及感染风险增加等不良反应<sup>[2]</sup>。NSAIDs 滴眼液可避免上述不良反应,因此在眼科的应用越来越广泛<sup>[3-4]</sup>,但近年来也有点状角膜炎、角膜浸润及溶解等不良反应的报道,这些报道中的病例多伴有糖尿病、自身免疫性疾病及干眼等<sup>[5]</sup>,因此应该重视 NSAIDs 滴眼液对局部组织的细胞毒性<sup>[6-7]</sup>。目前已有研究比较常见抗炎滴眼液对角膜上皮和结膜上皮的细胞毒性<sup>[8-9]</sup>,但引起细胞毒性的药物成分尚不清楚。本研究比较双氯芬酸钠滴眼液、普拉洛芬滴眼液和溴芬酸钠滴眼液以及原料药对人角膜上皮细胞(human corneal epithelial cells, HCECs)生物学行为的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

双氯芬酸钠滴眼液(0.4 ml/支)、普拉洛芬滴眼液(5 ml/支)、溴芬酸钠滴眼液(5 ml/支)及其原料药均由日本千寿制药株式会社提供,其成分见表 1。原料药均采用 DMEM/F-12(美国 Invitrogen 公司)培养液配制,原料药质量分数与相应滴眼液有效成分质量分数相同。

表 1 3 种 NSAIDs 滴眼液的原料药及其添加物

药物	原料药	添加物	pH
双氯芬酸钠滴眼液	双氯芬酸钠(0.1%)	玻璃酸钠	7.0-8.5
普拉洛芬滴眼液	普拉洛芬(0.1%)	0.007% 苯扎氯铵	7.5-8.5
溴芬酸钠滴眼液	溴芬酸钠(0.1%)	0.005% 苯扎氯铵	7.5-8.5

注: NSAIDs: 非甾体类抗炎药

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** HCECs 系(韩国 Choun-Ki Joo 教授提供)在 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,培养液为含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12。

**1.2.2 四甲基偶氮唑盐法检测 HCECs 增生率** 将 HCECs 以 3×10<sup>3</sup>/孔的密度接种于 96 孔板,待细胞贴壁后 24 h 更换含不同质量浓度(滴眼液分别进行 1、2、5、10 倍稀释,配制的最终质量分数分别为 0.10%、

0.05%、0.02%、0.01%)药物的培养基并分别处理 1、2、4、24 h,然后更换为 200 μl 无血清培养基,并加入 5 mg/ml 四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 20 μl,孵育 4 h 后,加入 DMSO,待溶解后用 SpectraMax M2 全波长酶标仪测定波长 490 nm 的吸光度(A)值,细胞增生率 = 实验组 A 值/对照组 A 值 × 100%。

**1.2.3 Transwell 小室法测定 HCECs 迁移率** 采用 8 μm 孔径的 Transwell 小室进行 HCECs 迁移能力检测。用含质量浓度 0.002% (1:50)药物的无血清培养液重悬细胞,将 5×10<sup>4</sup> 个细胞接种于 Transwell 上室,下室加入含体积分数 1% 胎牛血清的培养液,培养 15 h 后用棉签擦除小室膜上方的细胞,用质量分数 0.1% 结晶紫染色并照相,计数跨膜细胞的数量。重复 3 次,取其平均值。细胞迁移率 = 实验组迁移数/对照组迁移数 × 100%。

**1.2.4 细胞乳酸脱氢酶含量检测** 定量测定细胞培养液中的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)含量,评价细胞的损伤程度<sup>[10]</sup>。采用 LDH 检测试剂盒(美国 Promega 公司)比较 3 种滴眼液及其原料药对细胞损伤的程度。细胞以 5×10<sup>3</sup>/孔的密度接种于 96 孔板,待细胞贴壁 24 h 后吸出培养基,加入含不同质量药物(滴眼液稀释同 1.2.2)的培养基处理 1、2、4、24 h,收集细胞上清,以质量分数 1% Triton X-100 裂解细胞组为 LDH 的最大释放量,以未处理组为 LDH 的自发释放量,各药物处理组作为 LDH 的刺激释放量评估细胞的损伤程度。细胞损伤率(%) = LDH 刺激释放量/LDH 最大释放量 × 100%。实验重复 3 次,取其平均值。以未用药的处理组作为对照组,其细胞损伤率转换即为 100%,各药物处理组的细胞损伤率与对照组的比进行数据转换,以便于比较。

### 1.3 统计学方法

采用 SAS 9.2 统计学软件(美国 SAS Institute Inc.)进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布。采用均衡分组区组实验设计,不同药物在不同作用时间或不同药物在不同稀释比例下作用后 HCECs 的增生率、迁移率和细胞损伤率的总体差异比较采用区组设计两因素方差分析,多重比较采用 Bofferroni 检验。采用双尾检测法,

$P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3 种滴眼液对 HCECs 的毒性作用

**2.1.1 3 种滴眼液作用不同时间后 HCECs 增生率的变化** 在 1:1 稀释比例下, 3 种不同药物作用后 HCECs 增生率明显不同, 差异有统计学意义 ( $F_{\text{药物}} = 20.25, P = 0.00$ ), 其中双氯芬酸钠滴眼液和普拉洛芬滴眼液药物作用后 1 h HCECs 的增生率明显低于溴芬酸钠滴眼液作用组, 普拉洛芬滴眼液药物作用后 4 h HCECs 的增生率明显低于双氯芬酸钠滴眼液和溴芬酸钠滴眼液作用组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。不同药物作用不同时间后 HCECs 增生率变化的总体比较差异无统计学意义 ( $F_{\text{时间}} = 2.38, P = 0.12$ ) (表 2)。

**表 2 3 种滴眼液 1:1 稀释比例下作用不同时间后 HCECs 的增生率 ( $\bar{x} \pm s, A, \%$ )**

药物	样本量	作用不同时间后 HCECs 的增生率		
		1 h	2 h	4 h
双氯芬酸钠滴眼液	4	27.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	31.4 ± 0.8	31.5 ± 2.2 <sup>b</sup>
普拉洛芬滴眼液	4	27.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	29.8 ± 1.4	26.4 ± 1.3
溴芬酸钠滴眼液	4	33.7 ± 1.4	32.4 ± 2.5	31.6 ± 1.7 <sup>b</sup>

注:  $F_{\text{药物}} = 20.25, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 2.38, P = 0.12$ 。与各自时间点溴芬酸钠滴眼液比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与各自时间点普拉洛芬滴眼液比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (区组设计两因素方差分析, Bofferroni 检验) HCECs: 人角膜上皮细胞

**2.1.2 3 种滴眼液不同稀释比例作用后 HCECs 增生率的比较** 不同稀释比例的双氯芬酸钠滴眼液作用不同时间后 HCECs 增生率明显不同, 随着药物稀释比例的增加, HCECs 增生率逐渐增加, 差异有统计学意义 ( $F_{\text{稀释比例}} = 15.15, P = 0.00$ ), 各剂量组药物作用不同时间 HCECs 的增生率稳定, 总体比较差异无统计学意义 ( $F_{\text{时间}} = 0.16, P = 0.85$ ) (表 3)。不同稀释比例普拉洛芬滴眼液作用不同时间 HCECs 增生率均发生明显改变, HCECs 增生率随着稀释比例的增大而增加, HCECs 的增生率在药物作用 1 h 时最低, 药物作用 2 h 后, HCECs 增生率逐渐增加且稳定, 差异均有统计学意义 ( $F_{\text{稀释比例}} = 371.24, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 190.43, P = 0.00$ ) (表 4)。不同稀释比例的溴芬酸钠滴眼液在不同时间 HCECs 增生率差异明显不同, 随着稀释比例的增加, HCECs 增生率明显增加, 总体比较差异有统计学意义 ( $F_{\text{稀释比例}} = 220.61, P = 0.00$ ), 溴芬酸钠滴眼液在不同时间点 HCECs 增生率差异有统计学意义

( $F_{\text{时间}} = 56.11, P = 0.00$ ) (表 5)。

**表 3 不同稀释比例下双氯芬酸钠滴眼液作用不同时间后 HCECs 的增生率 ( $\bar{x} \pm s, A, \%$ )**

稀释比例	样本量	作用不同时间后 HCECs 增生率		
		1 h	2 h	4 h
1:1	4	27.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	31.4 ± 0.8 <sup>a</sup>	31.5 ± 2.2
1:2	4	28.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	31.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	32.0 ± 1.7
1:5	4	31.2 ± 1.7 <sup>a</sup>	30.8 ± 1.4 <sup>a</sup>	31.4 ± 1.7
1:10	4	40.7 ± 6.1	35.6 ± 1.4	33.0 ± 0.5

注:  $F_{\text{稀释比例}} = 15.15, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 0.16, P = 0.85$ 。与各自 1:10 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (区组设计两因素方差分析, Bofferroni 检验) HCECs: 人角膜上皮细胞

**表 4 不同稀释比例下普拉洛芬滴眼液作用不同时间后 HCECs 的增生率 ( $\bar{x} \pm s, A, \%$ )**

稀释比例	样本量	作用不同时间后 HCECs 增生率		
		1 h	2 h	4 h
1:1	4	27.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	29.8 ± 1.4 <sup>a</sup>	26.4 ± 1.3
1:2	4	33.6 ± 1.1 <sup>a</sup>	31.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	32.0 ± 1.7
1:5	4	58.1 ± 3.9 <sup>a</sup>	34.6 ± 3.5 <sup>ab</sup>	33.3 ± 1.0 <sup>b</sup>
1:10	4	83.7 ± 3.4	75.9 ± 4.9	32.5 ± 1.3 <sup>b</sup>

注:  $F_{\text{稀释比例}} = 371.24, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 190.43, P = 0.00$ 。与各时间点的 1:10 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与各稀释比例组内的 1 h 值比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (区组设计两因素方差分析, Bofferroni 检验) HCECs: 人角膜上皮细胞

**表 5 不同稀释比例下溴芬酸钠滴眼液作用不同时间后 HCECs 的增生率 ( $\bar{x} \pm s, A, \%$ )**

稀释比例	样本量	不同时间点 HCECs 增生率		
		1 h	2 h	4 h
1:1	4	33.7 ± 1.4 <sup>ab</sup>	32.4 ± 2.5 <sup>a</sup>	31.6 ± 1.7 <sup>a</sup>
1:2	4	46.1 ± 4.6 <sup>a</sup>	35.2 ± 2.3 <sup>a</sup>	31.3 ± 1.6 <sup>ac</sup>
1:5	4	56.8 ± 1.1 <sup>a</sup>	39.0 ± 2.6 <sup>ac</sup>	32.0 ± 1.7 <sup>ac</sup>
1:10	4	84.6 ± 3.4	69.5 ± 9.1 <sup>c</sup>	65.1 ± 4.1 <sup>c</sup>

注:  $F_{\text{浓度}} = 220.61, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 56.11, P = 0.00$ 。与各时间点的 1:10 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与各时间点的 1:5 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与各稀释比例组内的 1 h 值比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (区组设计两因素方差分析, Bofferroni 检验) HCECs: 人角膜上皮细胞

### 2.2 3 种滴眼液作用后 HCECs 迁移率

质量浓度 0.002% 的 3 种滴眼液作用后 HCECs 迁移率明显不同, 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 103.43, P = 0.00$ ), 其中普拉洛芬滴眼液和溴芬酸钠滴眼液作用后 HCECs 迁移率明显高于双氯芬酸钠滴眼液, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ), 溴芬酸钠滴眼液作用后 HCECs 迁移率明显低于普拉洛芬滴眼液, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表 6)。

**表 6 3 种滴眼液对 HCECs 迁移率的影响 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )**

药物	样本量	HCECs 迁移率
双氯芬酸钠滴眼液	4	10.4±3.5
普拉洛芬滴眼液	4	135.3±28.6 <sup>a</sup>
溴芬酸钠滴眼液	4	86.1±11.6 <sup>ab</sup>
<i>F</i>		103.43
<i>P</i>		0.00

注:与双氯芬酸钠滴眼液比较,<sup>a</sup>*P*<0.01;与普拉洛芬滴眼液比较,<sup>b</sup>*P*<0.05(单因素方差分析,Bofferroni 检验) HCECs:人角膜上皮细胞

### 2.3 3 种滴眼液对 HCECs 损伤率的影响

**2.3.1 3 种滴眼液作用不同时间后 HCECs 损伤率的变化** 在 1:1 稀释比例下,3 种不同药物作用后 HCECs 中 LDH 释放量明显不同,差异有统计学意义 (*F*<sub>药物</sub> = 164.16, *P* = 0.00),其中双氯芬酸钠滴眼液和普拉洛芬滴眼液作用后 1 h HCECs 损伤率明显高于溴芬酸钠滴眼液作用组,而普拉洛芬滴眼液作用后 2 h、4 h HCECs 损伤率明显高于双氯芬酸钠滴眼液和溴芬酸钠滴眼液,差异均有统计学意义(均 *P*<0.05)。不同药物作用不同时间后 HCECs 损伤程度总体比较差异有统计学意义 (*F*<sub>时间</sub> = 3.65, *P* = 0.04) (表 7)。

**表 7 3 种滴眼液 1:1 稀释下作用不同时间 HCECs 损伤率 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )**

药物	样本量	不同时间点 HCECs 损伤率		
		1 h	2 h	4 h
双氯芬酸钠滴眼液	4	214.2±19.2	139.7±2.6 <sup>a</sup>	98.3±1.9 <sup>ab</sup>
普拉洛芬滴眼液	4	199.2±6.5	171.6±1.9 <sup>ac</sup>	164.6±3.7 <sup>ac</sup>
溴芬酸钠滴眼液	4	139.0±5.1 <sup>cd</sup>	109.7±8.9 <sup>ad</sup>	111.7±1.3 <sup>ad</sup>

注:*F*<sub>药物</sub> = 164.16, *P* = 0.00; *F*<sub>时间</sub> = 3.65, *P* = 0.04。与各种药物作用 1 h 比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;与各种药物作用 2 h 比较,<sup>b</sup>*P*<0.05;与各自时间点的双氯芬酸钠滴眼液比较,<sup>c</sup>*P*<0.05;与各自时间点普拉洛芬滴眼液比较,<sup>d</sup>*P*<0.05(区组设计两因素方差分析,Bofferroni 检验) HCECs:人角膜上皮细胞

**2.3.2 不同稀释比例下 3 种滴眼液 HCECs 损伤率的比较** 不同稀释比例的双氯芬酸钠滴眼液作用不同时间后 HCECs 的损伤率不同,差异有统计学意义 (*F*<sub>稀释比例</sub> = 156.02, *P* = 0.00),不同剂量药物作用不同时间 HCECs 的损伤率不同,差异有统计学意义 (*F*<sub>时间</sub> = 186.95, *P* = 0.00) (表 8)。不同稀释比例普拉洛芬滴眼液作用不同时间 HCECs 损伤率均发生明显改变,HCECs 损伤率随着稀释比例升高而降低,差异均有统计学意义 (*F*<sub>稀释比例</sub> = 94.28, *P* = 0.00; *F*<sub>时间</sub> = 442.93, *P* = 0.00) (表 9)。随着溴芬酸钠滴眼液稀释比例的增加,HCECs 损伤率明显降低,总体比

较差异有统计学意义 (*F*<sub>稀释比例</sub> = 22.91, *P* = 0.00),溴芬酸钠滴眼液在不同时间点对 HCECs 损伤程度差异有统计学意义 (*F*<sub>时间</sub> = 260.62, *P* = 0.00) (表 10)。

**表 8 不同稀释比例下双氯芬酸钠滴眼液作用不同时间 HCECs 损伤率 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )**

稀释比例	样本量	不同时间点 HCECs 损伤率		
		1 h	2 h	4 h
1:1	4	214.2±19.2	139.7±2.6 <sup>a</sup>	98.3±1.9 <sup>a</sup>
1:2	4	252.6±11.2	234.6±4.0 <sup>b</sup>	228.2±4.9 <sup>b</sup>
1:5	4	101.1±6.6 <sup>bc</sup>	124.1±9.8 <sup>c</sup>	272.3±14.2 <sup>ab</sup>
1:10	4	104.8±7.3 <sup>bc</sup>	104.6±4.6 <sup>c</sup>	174.9±22.7 <sup>abc</sup>

注:*F*<sub>稀释比例</sub> = 156.02, *P* = 0.00; *F*<sub>时间</sub> = 186.95, *P* = 0.00。与各自稀释比例组 1 h 值比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;与各自时间点 1:1 组比较,<sup>b</sup>*P*<0.05;与各自时间点 1:2 组比较,<sup>c</sup>*P*<0.05 (区组设计两因素方差分析,Bofferroni 检验) HCECs:人角膜上皮细胞

**表 9 不同稀释比例下普拉洛芬滴眼液作用不同时间 HCECs 损伤率 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )**

稀释比例	样本量	不同时间点 HCECs 损伤率		
		1 h	2 h	4 h
1:1	4	199.2±6.5	171.6±1.9	164.6±3.7 <sup>a</sup>
1:2	4	228.1±15.3	216.6±1.7	231.3±5.9
1:5	4	95.4±0.9 <sup>c</sup>	134.9±11.6 <sup>ac</sup>	262.3±4.5 <sup>b</sup>
1:10	4	103.1±10.2 <sup>c</sup>	83.6±4.1 <sup>ac</sup>	220.1±25.6 <sup>b</sup>

注:*F*<sub>稀释比例</sub> = 94.28, *P* = 0.00; *F*<sub>时间</sub> = 442.93, *P* = 0.00。与各自稀释比例 1 h 值比较,<sup>a</sup>*P*<0.05,<sup>b</sup>*P*<0.01;与各自时间点 1:1 组比较,<sup>c</sup>*P*<0.05 (区组设计两因素方差分析,Bofferroni 检验) HCECs:人角膜上皮细胞

**表 10 不同稀释比例下溴芬酸钠滴眼液作用不同时间 HCECs 损伤率 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )**

稀释比例	样本量	不同时间点 HCECs 损伤率		
		1 h	2 h	4 h
1:1	4	139.0±5.1	109.7±8.9	111.7±1.3
1:2	4	91.5±4.2 <sup>b</sup>	91.1±0.5	146.3±6.2 <sup>ab</sup>
1:5	4	81.1±2.3 <sup>b</sup>	66.3±2.6 <sup>b</sup>	157.3±4.4 <sup>ab</sup>
1:10	4	86.6±6.4 <sup>b</sup>	66.0±1.8 <sup>b</sup>	108.4±21.1 <sup>a</sup>

注:*F*<sub>稀释比例</sub> = 22.91, *P* = 0.00; *F*<sub>时间</sub> = 260.62, *P* = 0.00。与各自稀释比例的 1 h 值比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;与各自时间点 1:1 组比较,<sup>b</sup>*P*<0.05 (区组设计两因素方差分析,Bofferroni 检验) HCECs:人角膜上皮细胞

### 2.4 3 种原料药对 HCECs 的毒性作用

**2.4.1 3 种原料药作用 24 h 后 HCECs 增生率的变化** 采用 MTT 法检测 3 种滴眼液原料药对 HCECs 增生率的影响,不同原料药及不同稀释比例的原料药作用后 HCECs 增生率的差异均有统计学意义 (*F*<sub>药物</sub> = 332.27, *P*<0.00; *F*<sub>浓度</sub> = 122.01, *P* = 0.00)。在 1:1 稀释比例下,3 种原料药作用后 HCECs 增生率明显不同,差异有统计

学意义,双氯芬酸钠原料药和普拉洛芬原料药作用 24 h HCECs 的增生率明显低于溴芬酸钠原料药作用后 HCECs 的增生率。在 1:2、1:5 及 1:10 稀释比例下,3 种原料药作用后 HCECs 增生率在各自稀释比例组的差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(表 11)。

**表 11 3 种原料药在不同稀释比例下作用 24 h HCECs 的增生率( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

药物	样本量	不同稀释比例下 HCECs 增生率			
		1:1	1:2	1:5	1:10
双氯芬酸钠原料药	4	20.4±0.4 <sup>ac</sup>	20.2±0.1 <sup>ac</sup>	38.8±5.3 <sup>ac</sup>	69.7±3.4 <sup>a</sup>
普拉洛芬原料药	4	82.2±8.0 <sup>c</sup>	92.8±4.8 <sup>c</sup>	105.9±4.3	113.7±8.4
溴芬酸钠原料药	4	23.8±0.5 <sup>ac</sup>	58.4±2.9 <sup>abc</sup>	73.0±2.7 <sup>ab</sup>	94.2±13.4 <sup>ab</sup>

注: $F_{药物} = 332.27, P = 0.00; F_{浓度} = 122.01, P = 0.00$ 。与各自稀释比例普拉洛芬原料药比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与各自稀释比例双氯芬酸钠原料药比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与各自药物 1:10 稀释比较值比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ (区组设计两因素方差分析,Bofferoni 检验) HCECs:人角膜上皮细胞

**2.4.2 3 种原料药作用 24 h HCECs 迁移率的变化** 采用 Transwell 法检测 3 种原料药(1:50 稀释,最终质量分数为 0.002%)对 HCECs 迁移能力的影响,HCECs 作用时间为 15 h。不同药物在 1:50 稀释比例下 HCECs 迁移率明显不同,总体比较差异有统计学意义( $F = 23.02, P = 0.00$ ),其中普拉洛芬和溴芬酸钠作用后 HCECs 迁移率明显高于双氯芬酸钠,差异均有统计学意义( $t = 61.00, 45.37$ ,均  $P < 0.01$ )(表 12)。

**表 12 3 种原料药作用后 HCECs 迁移率( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

药物	样本量	HCECs 迁移率
双氯芬酸钠	4	42.7±3.5
普拉洛芬	4	134.8±13.3 <sup>a</sup>
溴芬酸钠	4	107.9±12.4 <sup>a</sup>
<i>F</i>		23.02
<i>P</i>		0.00

注:与双氯芬酸钠比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ (单因素方差分析,Bofferoni 检验) HCECs:人角膜上皮细胞

**2.4.3 3 种原料药对 HCECs 损伤率的影响** 不同稀释比例的原料药 HCECs 的损伤率明显不同,总体比较差异有统计学意义( $F_{药物} = 154.83, P = 0.00; F_{浓度} = 117.81, P = 0.00$ ),其中双氯芬酸钠原料药和溴芬酸钠原料药作用后 HCECs 的损伤率随着稀释比例加大而逐渐降低,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ );在同等的稀释比例下,普拉洛芬原料药的 HCECs 损伤率明显低于双氯芬酸钠原料药和溴芬酸钠原料药,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )(表 13)。

**表 13 3 种原料药在不同稀释比例下作用 24 h 后 HCECs 的损伤率( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

药物	样本量	不同稀释比例下 HCECs 的损伤率			
		1:1	1:2	1:5	1:10
双氯芬酸钠原料药	4	239.1±4.4	131.1±14.0 <sup>a</sup>	87.0±6.4 <sup>a</sup>	94.0±5.5 <sup>a</sup>
普拉洛芬原料药	4	82.4±6.6 <sup>b</sup>	86.7±6.8 <sup>b</sup>	86.4±3.1	94.9±8.2 <sup>a</sup>
溴芬酸钠原料药	4	122.2±4.7 <sup>b</sup>	95.7±3.0 <sup>ab</sup>	100.8±5.5 <sup>a</sup>	103.6±13.0

注: $F_{药物} = 154.83, P = 0.00; F_{浓度} = 117.81, P = 0.00$ 。与各自药物的 1:1 稀释比例值比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与各自稀释比例下双氯芬酸钠原料药比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ (区组设计两因素方差分析,Bofferoni 检验) HCECs:人角膜上皮细胞

### 3 讨论

眼科手术后的抗炎药物局部应用可造成眼表上皮损伤,部分原因是药物本身的刺激。本研究中检测 3 种 NSAIDs 滴眼液及其原料药对离体培养的 HCECs 增生、迁移和损伤的影响,结果显示双氯芬酸钠滴眼液对 HCECs 的毒性作用最强,其次为普拉洛芬滴眼液和溴芬酸钠滴眼液,但上述药物的原料药在低质量浓度时对 HCECs 毒性作用均较小,且 3 种原料药间差别不大,但随着质量浓度的增加,双氯芬酸钠原料药对 HCECs 增生、迁移的影响较大,HCECs 损伤的程度更为严重,其次为溴酚酸钠原料药,普拉洛芬原料药的细胞毒性不明显。

NSAIDs 近年来广泛应用于临床,主要的作用机制是抑制花生四烯酸在环氧合酶作用下合成前列腺素,但前列腺素是合成蛋白质和 DNA 的必要成分,这也是 NSAIDs 滴眼液产生眼表毒性的主要原因<sup>[6,11]</sup>。双氯芬酸钠是苯乙酸类衍生物,与溴芬酸钠和普拉洛芬不同的是,它不但抑制前列腺素的合成,还能抑制脂氧化酶的生成,直接减少白三烯的合成,同时还促进花生四烯酸与三酰甘油结合,降低细胞内游离的花生四烯酸浓度,间接抑制白三烯合成。花生四烯酸也是维持细胞结构完整的重要成分,细胞内花生四烯酸浓度过低会增加细胞膜通透性,造成细胞毒性<sup>[12-13]</sup>。在本研究中发现双氯芬酸钠滴眼液及其原料药对 HCECs 的毒性作用显著大于普拉洛芬和溴芬酸钠,与其他研究结果一致<sup>[14-15]</sup>,但其机制是否与其多靶点的特性有关,还需要进一步研究。

为了防止污染,促进溶解,延长半衰期或在眼表的存留时间,在制备滴眼液过程中需添加防腐剂或其他缓冲成分。研究发现,长期应用含防腐剂的滴眼液可造成泪膜稳定性降低、杯状细胞密度降低、眼表上皮鳞状化生和角膜上皮屏障功能的破坏,甚至导致角膜缘干细胞缺乏症,因此应避免长期应用含有防腐剂的滴

眼液<sup>[16-23]</sup>。本研究中发现,即使去除防腐剂成分,双氯芬酸钠滴眼液的细胞毒性仍明显强于含防腐剂的普拉洛芬和溴芬酸钠滴眼液,同时原料药的细胞毒性实验也得出相似的结论。双氯芬酸钠本身的多靶点特性或其添加物玻璃酸钠可能延长了药物的作用时间,从而导致其细胞毒性明显高于其他 2 种药物。

总之,双氯芬酸钠滴眼液、普拉洛芬滴眼液和溴芬酸钠滴眼液对 HCECs 的毒性作用存在一定差异,但原料药本身的细胞毒性明显小于滴眼液,说明其毒性来源是添加物本身或原料药与添加物综合作用的结果。

## 参考文献

- [1] McColgin AZ, Heier JS. Control of intraocular inflammation associated with cataract surgery[J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2000, 11(1): 3-6.
- [2] McGhee CN, Dean S, Danesh-Meyer H. Locally administered ocular corticosteroids: benefits and risks[J]. *Drug Saf*, 2002, 25(1): 33-55.
- [3] Assouline M, Renard G, Arne JL, et al. A prospective randomized trial of topical soluble 0.1% indomethacin versus 0.1% diclofenac versus placebo for the control of pain following excimer laser photorefractive keratectomy[J]. *Ophthalmic Surg Lasers*, 1998, 29(5): 365-374.
- [4] 朱光辉, 王奇志, 蔡彩琴, 等. 非甾体类抗炎药在眼科中的应用研究进展[J]. *眼视光学杂志*, 2009, 11: 157-160.
- [5] Guidera AC, Luchs JI, Udell IJ. Keratitis, ulceration, and perforation associated with topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs[J]. *Ophthalmology*, 2001, 108(5): 936-944.
- [6] Lindstrom R. The pharmacologic and pathophysiologic rationale for using NSAIDs in ocular inflammatory disease and ocular surgery[J]. *Int Ophthalmol Clin*, 2006, 46(4): 7-11.
- [7] Hersh PS, Rice BA, Baer JC, et al. Topical nonsteroidal agents and corneal wound healing[J]. *Arch Ophthalmol*, 1990, 108(4): 577-583. doi: 10.1001/archoph.1990.01070060125062.
- [8] Qu M, Wang Y, Yang L, et al. Different cellular effects of four anti-inflammatory eye drops on human corneal epithelial cells; independent in active components[J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 3147-3155.
- [9] Ayaki M, Iwasawa A, Soda M, et al. Cytotoxicity of five fluoroquinolone and two nonsteroidal anti-inflammatory benzalkonium chloride-free ophthalmic solutions in four corneconjunctival cell lines[J]. *Clin Ophthalmol*, 2010, 4: 1019-1024.
- [10] Yoon JJ, Chawla D, Paal T, et al. High-throughput screening-based identification of paramyxovirus inhibitors[J]. *J Biomol Scr*, 2008, 13(7): 591-608. doi: 10.1177/1087057108321089.
- [11] Fornai M, Antonioli L, Colucci R, et al. NSAID-induced enteropathy: are the currently available selective COX-2 inhibitors all the same? [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 348(1): 86-95. doi: 10.1124/jpet.113.207118.
- [12] Ku EC, Lee W, Kothari HV, et al. Effects of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade[J]. *Am J Med*, 1986, 80(4B): 18-23.
- [13] Uyumura SA, Santos AC, Mingatto FE, et al. Diclofenac sodium and mefenamic acid: potent inducers of the membrane permeability transition in renal cortex mitochondria [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 342(2): 231-235.
- [14] O'Brien TP, Li QJ, Sauerburger F, et al. The role of matrix metalloproteinases in ulcerative keratolysis associated with perioperative diclofenac use[J]. *Ophthalmology*, 2001, 108(4): 656-659.
- [15] Hsu JK, Johnston WT, Read RW, et al. Histopathology of corneal melting associated with diclofenac use after refractive surgery [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2003, 29(2): 250-256.
- [16] 李骏, 晏晓明. 苯扎氯胺对体外培养的人角膜上皮细胞毒性作用的研究[J]. *眼科研究*, 2008, 26(11): 814-817. doi: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2008.11.004.
- [17] Noecker R. Effects of common ophthalmic preservatives on ocular health[J]. *Adv Ther*, 2001, 18(8): 205-215.
- [18] Mantelli F, Tranchina L, Lambiase A, et al. Ocular surface damage by ophthalmic compounds [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2011, 11(5): 464-470. doi: 10.1097/ACI.0b013e32834a95e9.
- [19] Patel M, Fraunfelder FW. Toxicity of topical ophthalmic anesthetics [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013, 9(8): 983-988. doi: 10.1517/17425255.2013.794219.
- [20] Chen W, Zhang Z, Hu J, et al. Changes in rabbit corneal innervation induced by the topical application of benzalkonium chloride[J]. *Cornea*, 2013, 32(12): 1599-1606. doi: 10.1097/ICO.0b013e3282a8196f.
- [21] Lin Z, He H, Zhou T, et al. A mouse model of limbal stem cell deficiency induced by topical medication with the preservative benzalkonium chloride [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(9): 6314-6325. doi: 10.1167/iovs.12-10725.
- [22] Kaur IP, Lal S, Rana C, et al. Ocular preservatives: associated risks and newer options [J]. *Cutan Ocul Toxicol*, 2009, 28(3): 93-103. doi: 10.1080/15569520902995834.
- [23] Tong L, Petznick A, Lee S, et al. Choice of artificial tear formulation for patients with dry eye; where do we start? [J]. *Cornea*, 2012, Suppl 1: S32-36. doi: 10.1097/ICO.0b013e328269cb99.

(收稿日期: 2015-01-09)

(本文编辑: 尹卫靖)

读者 · 作者 · 编者

## 本刊对来稿中作者署名的著录要求

作者向本刊投稿时署名应符合以下条件: (1) 参与课题的选题和实验设计, 参与实验资料的收集、分析和论证。 (2) 参与论文的起草或能够对论文中的方法学或关键部分进行修改。 (3) 能对审稿专家和编辑提出的修改意见进行核修, 能够答疑并承担责任。仅参与筹得资金或收集资料者以及仅对科研小组进行一般管理者均不宜署名为作者。文中如有外籍作者, 应附外籍作者亲笔签名在本刊发表的同意函。集体署名的文章应于题名下列出署名单位, 于文末列出论文整理者的姓名, 并须明确该文的主要责任者。

作者署名的名次应按对论文贡献大小顺序排列于文题下方, 每篇论文须列出通信作者 1 名。如无特殊约定, 则视第一作者为通信作者。作者 (包括通信作者) 的署名及其排序应在投稿前由所有研究者共同讨论确定, 在编排过程中不宜变更或增减, 尤其是通信作者和前三名作者, 若确需变动者须提供所有署名作者的签名同意函并出示单位证明。有英文文题的论著和综述应有全部作者姓名的汉语拼音, 列于英文文题之下。

(本刊编辑部)