

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫 : 探討菊苣攝食對小鼠乾眼症模式之淚腺分泌及結膜杯 *
* 名稱 : 狀細胞密度之效應 *
* ***** *

執行計畫學生： 呂宗漢
學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-030-B
研究期間： 105年07月01日至106年02月28日止，計8個月
指導教授： 林培正

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 106年03月29日

探討菊苣攝食對小鼠乾眼症模式之淚腺分泌及結膜杯狀

細胞密度之效應

(一)摘要

菊苣原產自歐洲，後流傳至中國新疆一帶，作為傳統中藥材已有百年之久。民間流傳菊苣具明目功效，可用於諸如乾眼、青光眼、白內障等眼疾之治療，但缺少科學證據。因此，本研究以紫外線 B(UV-B)照射導致小鼠乾眼症作為研究模式，並根據先前菊苣高低溫烘焙之比較研究，選用效果較好之低溫烘焙菊苣粉末，以探討餵食低溫烘焙菊苣乾燥粉末(GC)是否具有緩解乾眼症狀之功效，並進一步對各淚腺做深入探討及有效劑量確定。研究方法為將 6 周齡雌性 ICR 小鼠隨機分為(1)空白控制組、(2) UVB 傷害組(傷害加上餵食 0.9 % NaCl)、(3)菊苣 10 mg/kg(UVB 傷害加上餵食低溫烘焙菊苣乾燥粉末)、(4)菊苣 100 mg/kg (UVB 傷害加上餵食低溫烘焙菊苣乾燥粉末)、(5)菊苣 300 mg/kg (UVB 傷害加上餵食低溫烘焙菊苣乾燥粉末)、(6)菊苣 500 mg/kg (UVB 傷害加上餵食低溫烘焙菊苣乾燥粉末)。實驗共計 11 天，各組小鼠除控制組與傷害組餵食生 0.9% 生理食鹽水外，其餘組別先餵食 3 天菊苣後再連續 7 日，每日照射 UV-B 誘發乾眼症狀，並之後每日餵食菊苣，於第 0、4、7 日測量其淚液分泌量與淚液膜破裂時間，並於第 8 日偵測眼球表面之平滑度、透明度、角膜地圖、並且進行角膜染色及拍照，眼球與各淚腺體固定包埋切片後利用 IHC 抗體染色做分析，結膜杯狀細胞情形則利用 PAS 染色觀察，淚腺及麥氏腺也將以 IHC 抗體染色進行發炎分子 NF-kB、COX-2 分析並將數據量化做成指標以判斷其療效。本計畫將確定菊苣對緩解乾眼症之有效劑量，並且提供部分菊苣緩解乾眼症狀之作用機制。

關鍵字：菊苣、乾眼症、淚腺體、發炎因子、作用機制

(二)研究動機與研究問題

菊苣，原產自歐洲，後流傳至中國新疆一帶，作為傳統中藥材已有百年之久。民間流傳，此物具涼血、清熱等功效，又主治眼疾，諸如青光眼、白內障等，療效極佳，故常作為明目之用。

雖說民間推崇其強大之療效，但並無科學上之有力證據佐之，而現今的醫藥資訊，則甚少有關菊苣對於乾眼症療效的敘述，因此，在與指導老師多方討論後，決定對其做相關研究，一來確立菊苣在科學證據上於乾眼症有實質之療效，二來在講究養生的現代，保健似乎是人們關注的議題，若能推廣菊苣的食用，進而研發菊苣相關保健產品，必定能對社會大眾之健康多盡一份心力。

本研究以小鼠作為臨床前試驗對象，利用 IHC 抗體染色及 PAS 染色去觀察角膜上之細胞情形及結膜上之杯狀細胞情形，輔以眼表拍照及淚腺體分析判斷菊苣

對眼睛哪些構造造成影響及其影響之機轉，並將數據量化做成指標以判斷其療效。

本研究所獲得的菊苣粉末有二，一為高溫烘培之菊苣粉末，二為低溫烘培之菊苣粉末，在與指導老師討論後，若未來推廣為護眼保健食品，菊苣之產品處理過程的溫度很可能會影響到其功效，故對二種粉末進行了初步小鼠研究，得到了低溫烘培之菊苣所產生之療效最佳，並於 2015 年 10 月在馬來西亞吉隆坡的亞太視光研討會(APOC; Asia Pacific Optometry Conference)上發表相關結果，獲得了不少肯定與回饋，於 2017 年三月在台北的生物醫學年度大會上發表更進一步之結果，亦獲得熱烈回響。

(三)文獻回顧與探討

(1) 菊苣

菊苣，為菊科菊苣屬之多年生草本植物，外觀莖面光滑，莖生葉少或退化，長圓狀披針形，簇生，苞片 2 層，外短內長，無毛。原產自南歐，後流傳至中國新疆一帶，作為傳統中草藥已有百餘年之久。根據「中華本草」記載，菊苣味苦、性寒，能清熱解毒，破瘀活血，排膿，治療黃疸、肺熱咳嗽、疔腫、痔瘡等，因性寒，脾胃陽虛與體質偏寒者不宜多食。根據民間驗方，生汁加蜂蜜，如長期飲用，能治各種眼疾，如青光眼、白內障、視力減退、弱視、夜盲症、眼底出血、視網膜出血等，其中，又廣為流傳其應用於乾眼症狀上的治療極佳。

菊苣富含有的豐富的維生素 A、C，葉酸、鈣質、鐵質、銅及膳食纖維等，其中又大量含特有的天然 Oligo 寡糖（果寡糖 Fructo-oligosaccharide），為乳酸菌及比菲德菌所需要之營養素，不易在胃部被分解破壞，可以幫助腸道蠕動。

民間利用菊苣作為護眼食品已行之有年，且傳有功效出現，但缺乏科學實驗依據，故本實驗將對菊苣做一系列動物試驗，並探討其在經過高溫(90°C)及低溫(65°C)烘培後，哪一種溫度烘培療效最好，以期驗證並推廣於保健用途上。

(2) 乾眼症

乾眼症，為現代人困擾之慢性疾病，亦為人類容易得到之眼疾，其發病之成因多樣，但大抵可分為兩大類：一類為導因於淚液分泌量的不足，包含了「原發性淚液分泌不足」及「次發性淚液分泌不足」，二類為淚液的揮發量過高所致。「原發性淚液分泌不足」的原因不明，至於「次發性淚液分泌不足」則常見於類風濕性關節炎等風濕免疫性疾病所引發之「乾燥症」影響。此外，任何減少角膜敏感度的狀況，例如糖尿病、隱形眼鏡的長期配戴、角膜手術、LASIK 近視手術等，也可能導致淚液分泌不足。第二類，則包含了長期的眼瞼發炎、正常但較大表面積的眼裂、甲狀腺眼疾等症狀。

乾眼症之病因主要有四點：

1. 水液層淚腺淚液分泌不足：
此為最常見的原因。先天性無淚腺、老年性淚腺功能降低或是一些自體免疫性疾病造成淚腺發炎、外傷、感染、自律神經失調，長期點某些眼藥水或服用某些藥物都會造成淚液分泌不足，隱形眼鏡長期配戴者亦然。
2. 油脂層分泌不足：
眼瞼疾病造成瞼板腺功能不良所致。
3. 粘蛋白層分泌不足：
缺乏維生素A1者、慢性結膜炎、化學性灼傷等。
4. 淚液過度蒸發、淚液膜分佈不均勻：
眼瞼疾病造成眼瞼閉合不良、眨眼次數減少、長時間停留在冷氣房或戶外強燥熱的環境中。

資料來源：臺大醫院眼科部

<https://www.ntuh.gov.tw/OPH/DocLib10/%E4%B9%BE%E7%9C%BC%E7%97%87.aspx>

台灣 wiki

<http://www.twwiki.com/wiki/%E4%B9%BE%E7%9C%BC%E7%97%87>

(3) 角膜

角膜，為眼睛最前端的一層透明薄膜，具十分敏感的神經末梢，如有外物接觸角膜，眼瞼便會不由自主地合上以保護眼睛。就組織學而言，角膜分為五層，由外而內依序是：上皮細胞層、前彈力層(Bowman 膜)、基質層、後彈力層(Descemet 膜)及內皮細胞層。

1. 上皮細胞層(epithelial layer)：是球結膜上皮的延續，為複層上皮，由 5~6 層有核上皮細胞組成。總厚度平均為 50 μm ，占整個角膜厚度的 10%。上皮細胞層再生能力強，損傷後再生較快，此層由前向後又分為三層：表層、中層、深層。
2. 前彈力層(lamina elastic anterior)：又稱 Bowman 膜，主要由膠原纖維所組成的一層均質透明膜，厚 8~14 μm ，無細胞成分，至角膜周邊部。前面與上皮細胞層界限清楚，而與後面的角膜基質界限不明顯。此層抵抗力弱，易被損傷，無再生能力。
3. 基質層(stroma)：占角膜厚度的 90%，厚約 500 μm 。由 200 多層與角膜表面平行的膠原纖維束薄板組成。基質的主要成分為 I、IV 型膠原，纖維薄板排列規整，各層互相成一定角度重疊，其間有固定的和游走的角膜基質細胞，並含有豐富的透明質酸和一定的粘多糖。此層損傷後無法再生，以癥痕組織所代替。
4. 後彈力層(lamina elastic posterior)：又稱 Descemet 膜，位於角膜基質層與內皮細胞層之間。成人厚度為 10~12 μm ，與角膜基質層界限清楚，是由

內皮細胞分泌產生的一層較堅硬透明的均質膜，富有彈性，抵抗力較強，損傷後可以再生。

5. 內皮細胞層(endothelium layer)：為單層六角形扁平細胞構成，具有角膜房水屏障的功能，正常情況下，房水不能透過此層滲入到角膜組織中。整個角膜內皮細胞總數約為 50 萬個。細胞厚 $5\mu\text{m}$ ，寬 $18\sim 20\mu\text{m}$ 。若角膜內皮細胞失去代償功能，則角膜可發生水腫和大泡性角膜病變。

角膜除上述五層結構外，表面還有一層淚液膜，含有一定比例的粘蛋白、水分和脂質，具有防止角膜乾燥、保持平滑及光學特性的作用。

資料來源：Orphanet J Rare Dis. 2009; 4: 7.

(4) 結膜

結膜，為一層薄而透明的黏膜，覆蓋於眼瞼後面，其構造分為上、下瞼結膜、球結膜及穹窿結膜。

1. 杯狀細胞數目眾多，可分泌黏液，提供淚膜以濕潤眼球表面。
2. Krause 氏腺：此腺體屬於副淚腺深部的穹窿結膜基質中，在上眼瞼的數目較下眼瞼多，可分泌水液性淚液，是構成淚膜中間層成分的重要腺體構造。
3. Wolfring 氏腺：也屬於副淚腺，位於結膜內，在上眼瞼的數目較下眼瞼數目多，可分泌水液性淚液。此腺體比 Krause 氏腺體積大，但數目相對的比較少。
4. Zeis 氏皮質腺 (glands of Zeis)：又稱為瞼緣腺，是較小型的皮質腺，開口位於睫毛的毛囊中，其分泌物屬於油性，部份可構成淚液膜的最外層構造，具有減緩眼表淚液膜水分揮發速度的功能。
5. Moll 氏腺(glands of Moll)：屬於汗腺的一種，位於睫毛的毛囊構造之間。於下眼瞼處的數目較多，腺體的開口多位於 Zeis 氏皮脂腺管或是睫毛的毛囊中。

資料來源：Korean J Ophthalmol. 2007 December; 21(4): 251 - 254.

Mol Cell Biol. 2007 January; 27(1): 182 - 194

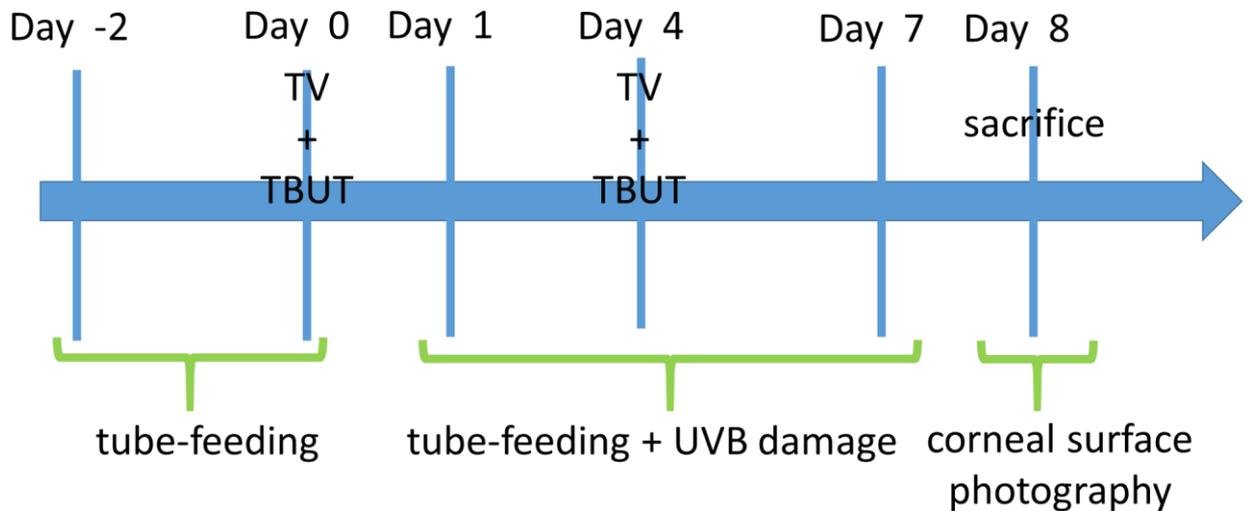
(四)研究方法及步驟

實驗器材：

ICR 小白鼠、Pipette、Tip、紫外線照射箱 (UVB)、螢光顯微鏡、淚液試紙、低溫烘焙之菊苣粉末(在本計畫中簡稱 GC; Green Powder-Cold)、切片機、IHC 所需之各項器材、烘箱。

實驗步驟：

實驗天數從 Day-2 開始計日，依序在 Day0、Day4 及 Day7 做淚液測試 (Tear volume)、淚液膜破裂時間測試 (TBUT)，Day8 為老鼠眼表拍照及犧牲後組織取下保存。以下為實驗流程圖：



ICR 小白鼠分為六組，每一組九隻，合計五十四隻，分別為：

- (1) 對照組(Blank)：每天早上進行食鹽水管餵。
- (2) 傷害組(Damage)：每天早上進行食鹽水管餵，並於 Day1 後進行 UV 傷害。
- (3) 菊苣 10 mg/kg (GC10 mg/kg)：每天早上進行菊苣 10 mg/kg 濃度管餵，並於 Day1 始進行 UV 傷害。
- (4) 菊苣 100 mg/kg(GC100 mg/kg)：每天早上進行菊苣 100 mg/kg 濃度管餵，並於 Day1 始進行 UV 傷害。
- (5) 菊苣 300 mg/kg(GC300 mg/kg) 每天早上進行菊苣 300 mg/kg 濃度管餵，並於 Day1 始進行 UV 傷害。
- (6) 菊苣 500 mg/kg(GC500 mg/kg) 每天早上進行菊苣 500 mg/kg 濃度管餵，並於 Day1 始進行 UV 傷害。

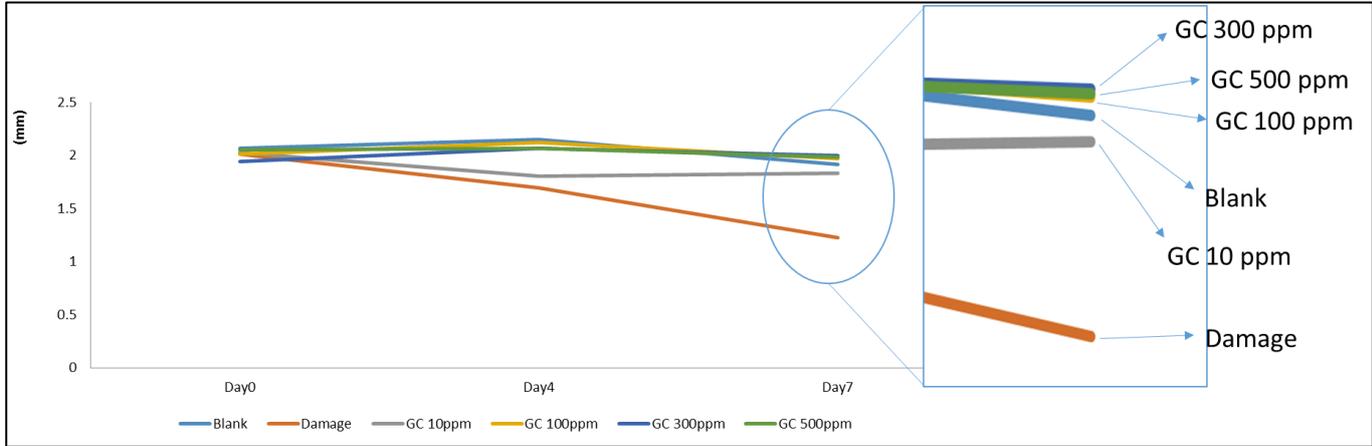
Day0、4、7 所作之測驗，為早上管餵完後，先做淚液測試 (Tear volume)，後進行紫外線照射傷害，如此重複直到所有組別完成，結束後需間隔四小時始能進行淚液膜破裂時間測試 (TBUT)。

Day8 當天不做任何管餵及測試，於早上開始對小鼠進行眼表拍照記錄，完成後將老鼠犧牲，取下眼睛及淚腺體，之後包埋並製做成切片進行抗體染色分析。本研究將分析各淚腺體與角膜上之細胞分布及發炎狀況，並對淚腺進行 PAS 染色分析，以探討杯狀細胞密度情形。

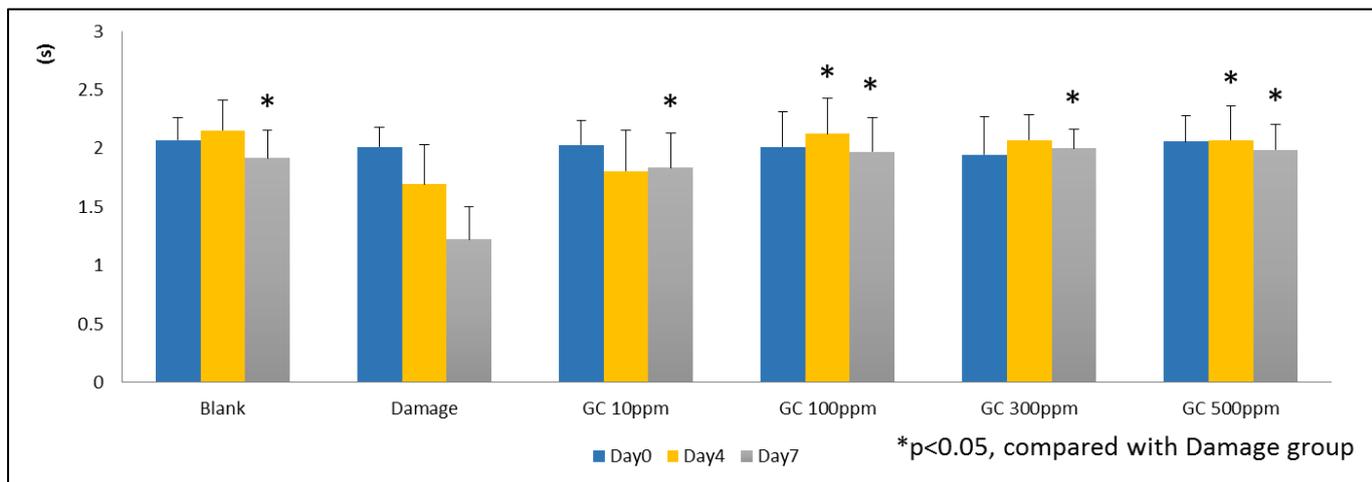
(五)研究結果

就淚液質量與眼球表面方面，實驗結果如下：

< A > 淚液量分析 (Tear Volume)



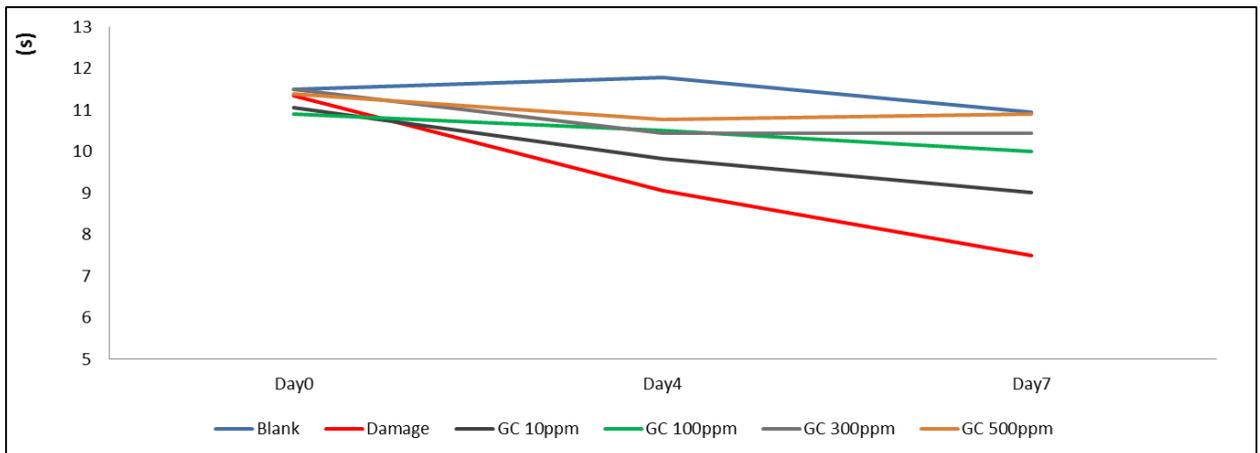
▲圖 1-1. 淚液量分析，從天數比較各組之趨勢。



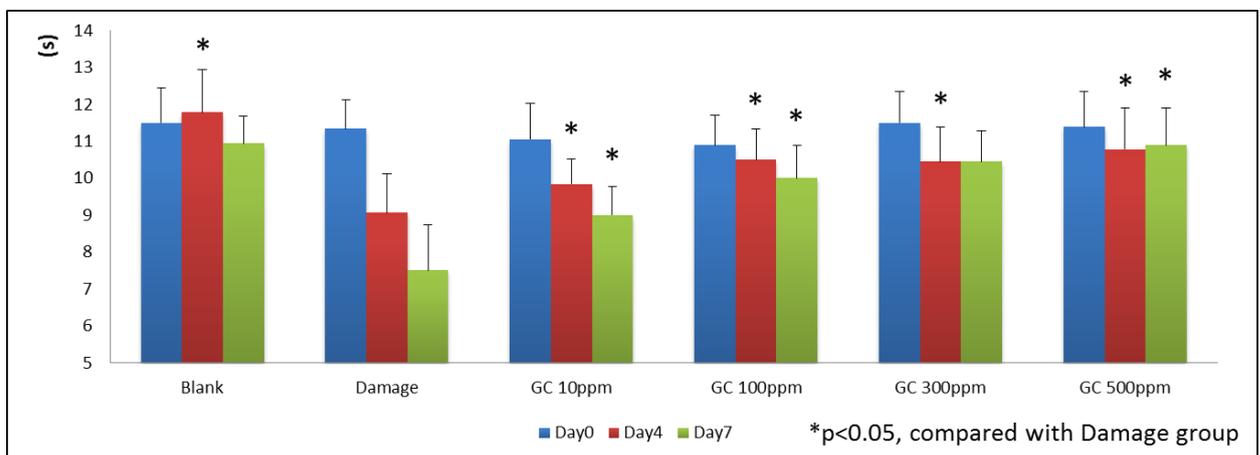
▲圖 1-2. 淚液量分析，從各組之天數對傷害組做比較。

淚液量分析，係指利用淚液試紙對小鼠進行淚液量的測試，一般而言，健康之小鼠可測得一定之淚液量，而有乾眼症狀之小鼠，其淚液量則大為減少。根據圖 1-1 與圖 1-2，發現各實驗組之淚液分泌量均高於傷害組，其中，在圖 1-1 可看到，GC 100 mg/kg 至 GC 500 mg/kg 於 Day 7 時皆高於 Blank 組，又三組線段如此接近，故初步推測有效劑量約 100 mg/kg 即可。而在圖 1-2，可以發現四組實驗組就天數間的比較而言，均優於傷害組，且各組在開始傷害後之測驗天數 (Day 4 與 Day 7)，其值亦維持穩定，故推論菊苣可能有達到預防乾眼症之效果。

 淚液膜破裂時間 (Tear Break Up Time)



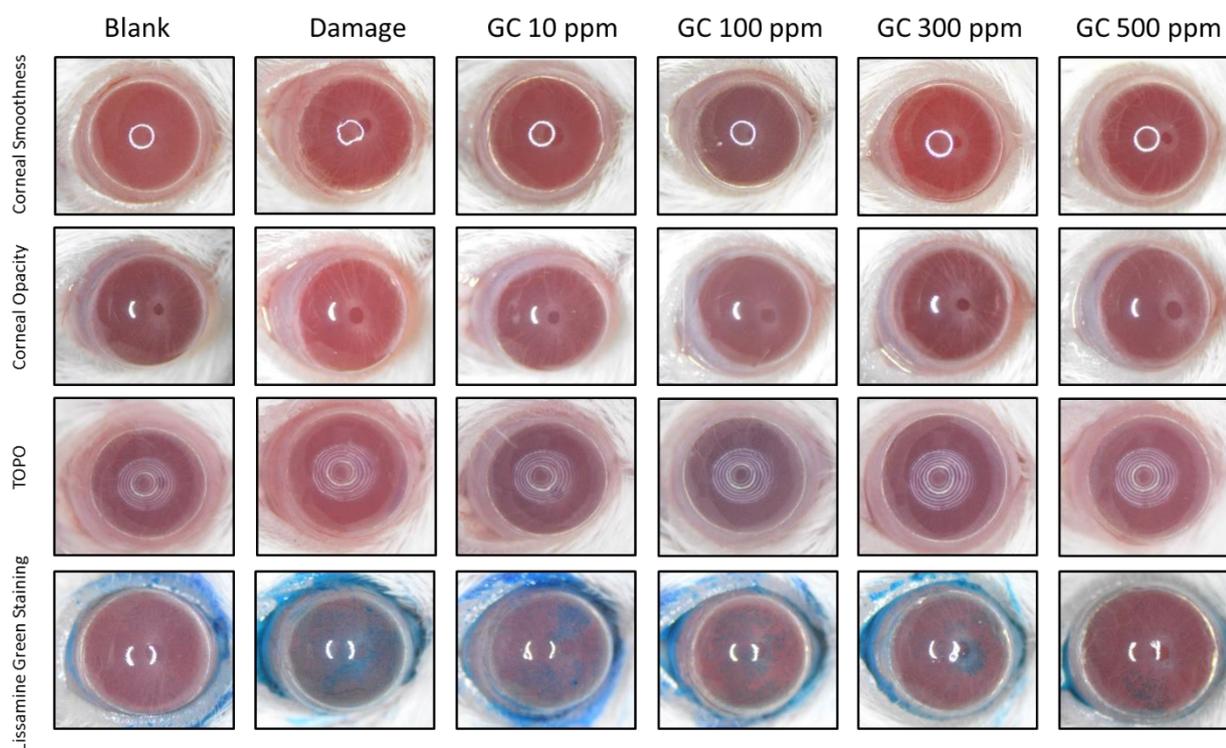
▲圖 2-1. 淚液膜破裂時間，從天數比較各組之趨勢。



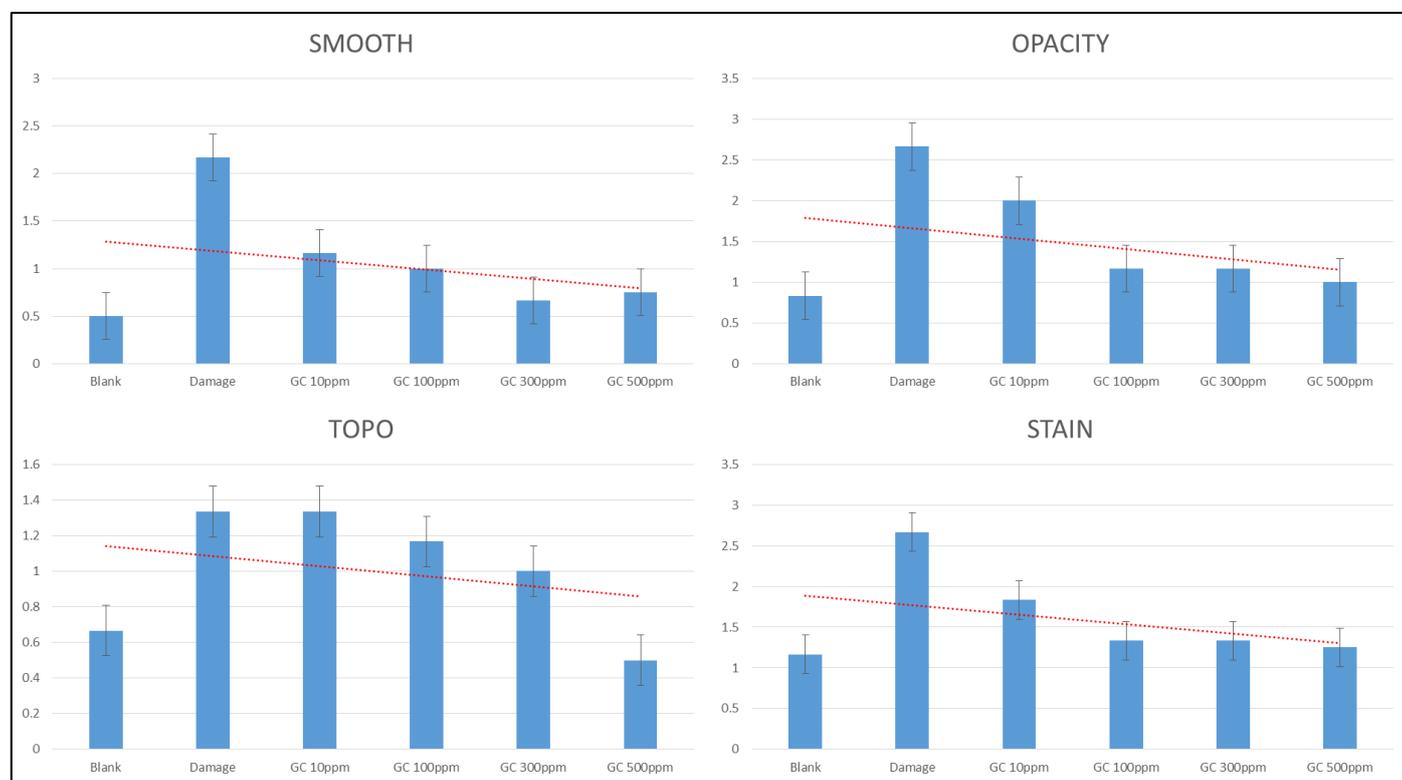
▲圖 2-2. 淚液膜破裂時間，從各組之天數對傷害組做比較。

淚液膜破裂時間，係指眨眼後，角膜上之淚液從完整覆蓋表面至開始出現破洞的維持時間，此測試可初步檢測淚液之品質，若淚液品質佳，則淚液膜可維持一定的時間；若不佳則時間減少。根據圖 2-1，可發現各實驗組之淚液維持時間皆較傷害組長，且各實驗組之間依濃度由高至低，維持時間依序遞減，而實驗控制組則高於各組，推論在淚液品質而言，縱使吃了藥劑，其傷害亦有一定影響，但在高劑量 500 mg/kg 於 Day 7 則接近控制組，可顯示其亦有一定之預防效用。

<C> 眼球表面拍照 (Ocular Surface Photography)



▲圖 3-1. 眼球表面拍照，由上而下之檢測項目依序為角膜平滑度、角膜透光度、角膜地圖儀與角膜染色。

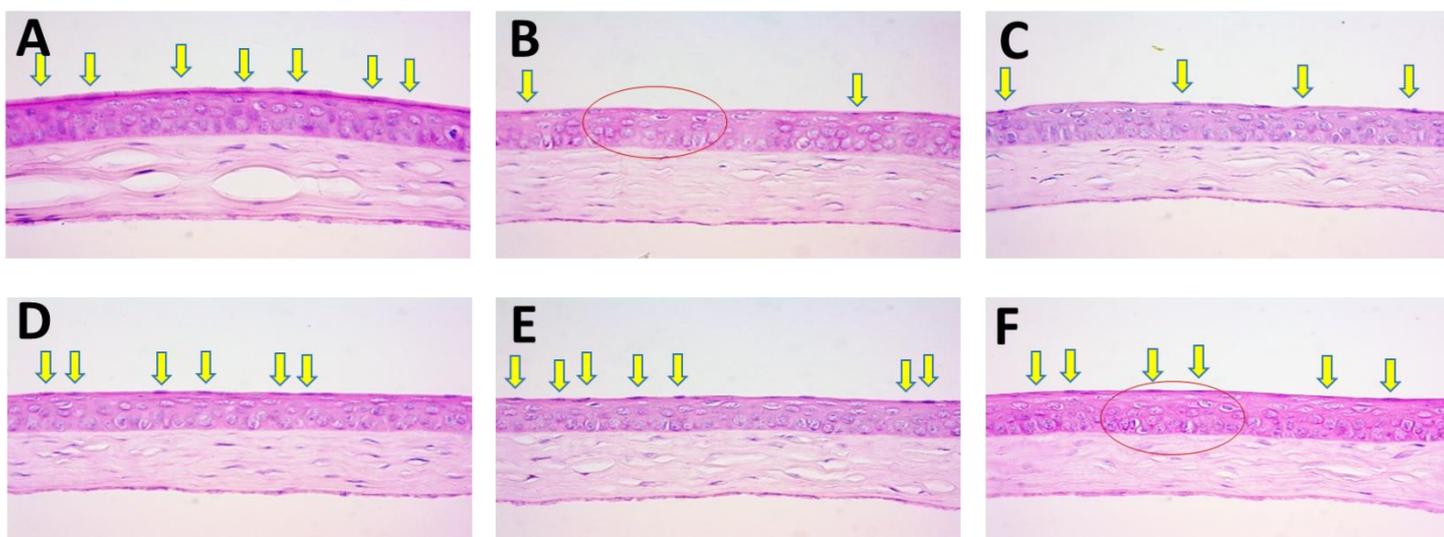


▲圖 3-2. 眼球表面拍照定量，根據所拍之照片對傷害程度做級數定量。

眼球表面拍照與定量，係對乾眼症狀之程度及緩解效果做系列比對與級數定量。根據圖 3-1，在角膜平滑度項目，控制組所觀察到之 LED 燈圈線條較傷害組圓，而傷害組之燈圈線條則較為扭曲變形；在角膜透光度項目，控制組之燈線顆粒清楚，而傷害組則一片模糊；在角膜地圖儀，控制組之同心圓圓滑一致，而傷害組則較為扭曲變形；在角膜染色項目，控制組之眼表較為乾淨無殘留染劑，而傷害組則有大量染劑殘留。以此規則判斷後四組實驗組並做成如圖 3-2 之級數定量統計，發現其趨勢皆往高劑量方面下滑，級數越少則效果越好，除了角膜地圖儀項目之 GC 10 mg/kg 與傷害組相近之外，其餘項目裡實驗組四組皆與傷害組有一定之落差，顯示菊苣在眼球表面有一定之保護作用。

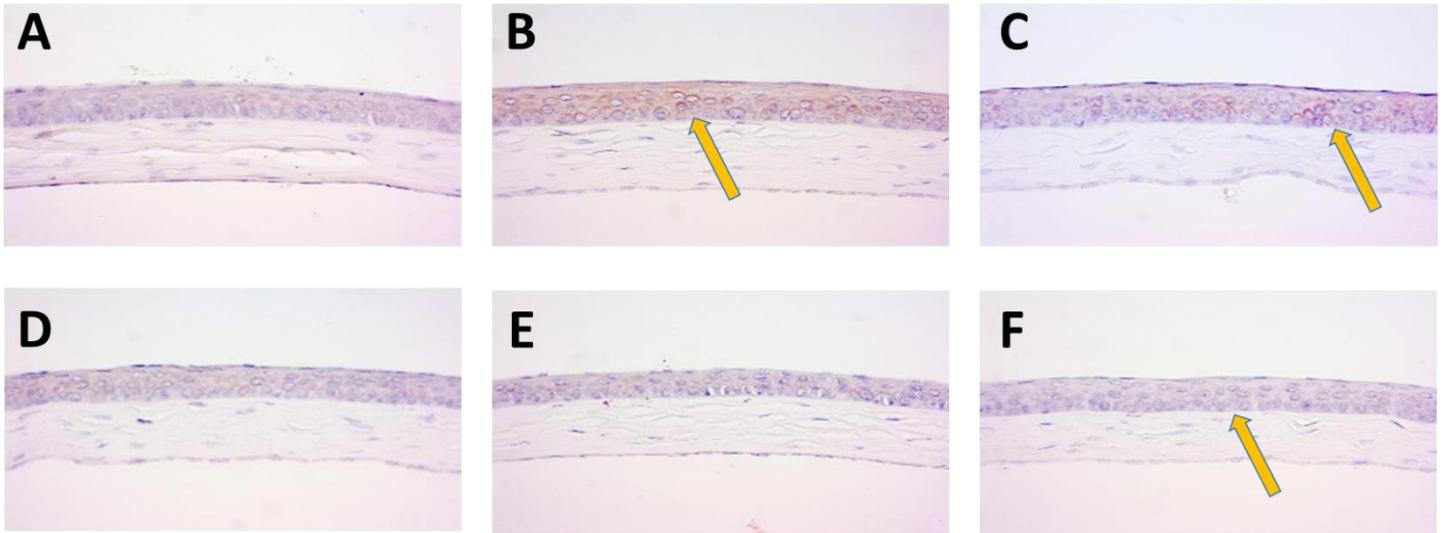
以上結果為小鼠在尚未犧牲前之活體測試，綜合三項檢測，可初步推論濃度最佳設定可以在 100 mg/kg。而下面將列出小鼠犧牲後之組織切片處理結果。

<D> 角膜染色 (Cornea Staining)

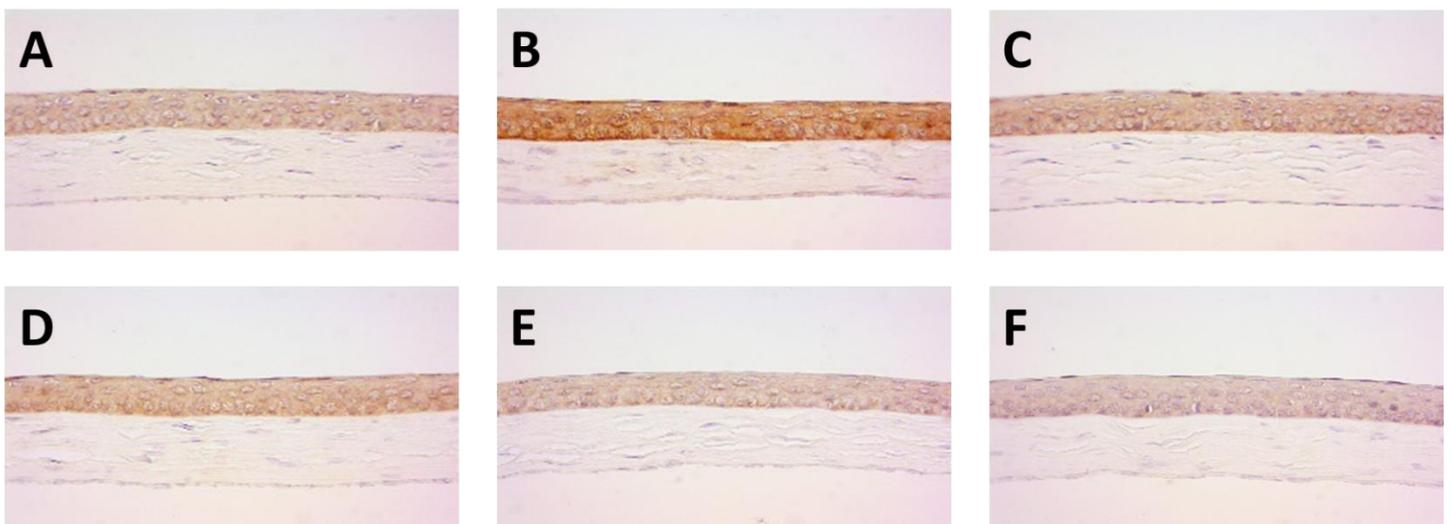


▲圖 4-1. 角膜蘇木紫—伊紅染色法(H.E. Stain)。A：Blank；B：Damage；C：GC 10 mg/kg；D：GC 100 mg/kg；E：GC 300 mg/kg；F：GC 500 mg/kg。

根據圖 4-1，可發現在控制組部分，其上皮細胞核數量較傷害組多，而濃度在 100 mg/kg 以上之實驗組在上皮細胞核數量之部分也較傷害組多；在基質層部分，控制組與高劑量之實驗組之細胞較為圓潤，而傷害組則相對萎縮。

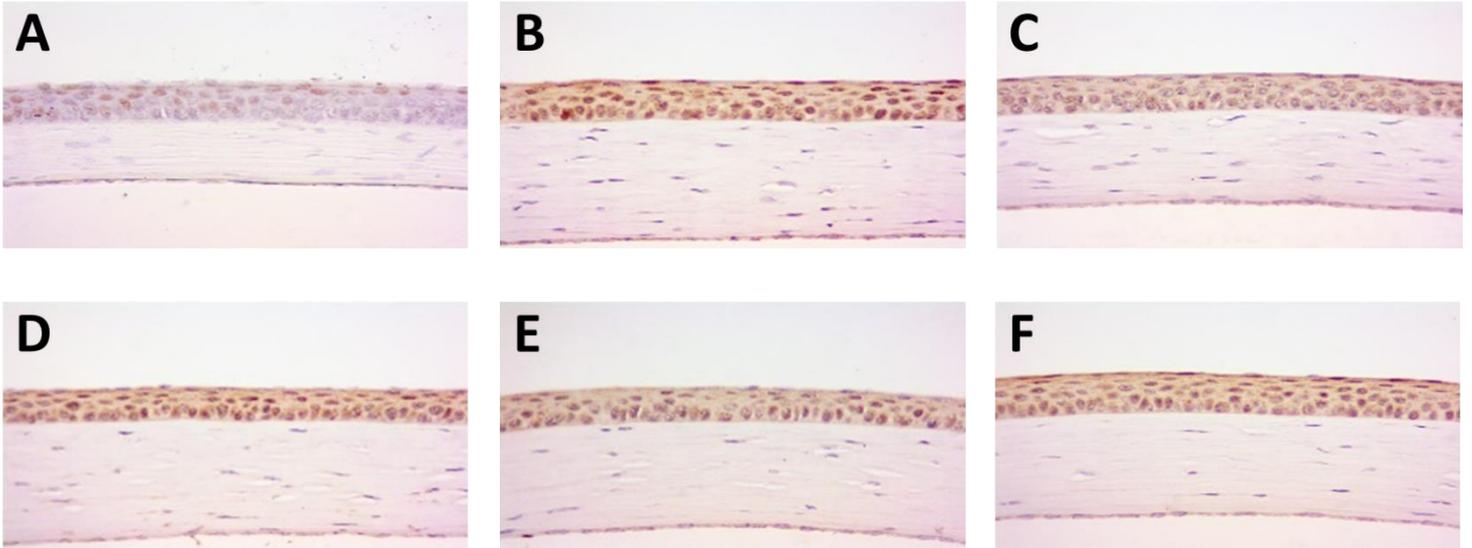


▲圖 4-2. 角膜 IHC 抗體染色法(COX-2)。A : Blank ; B : Damage ; C : GC 10 mg/kg ; D : GC 100 mg/kg ; E : GC 300 mg/kg ; F : GC 500 mg/kg 。(400X)

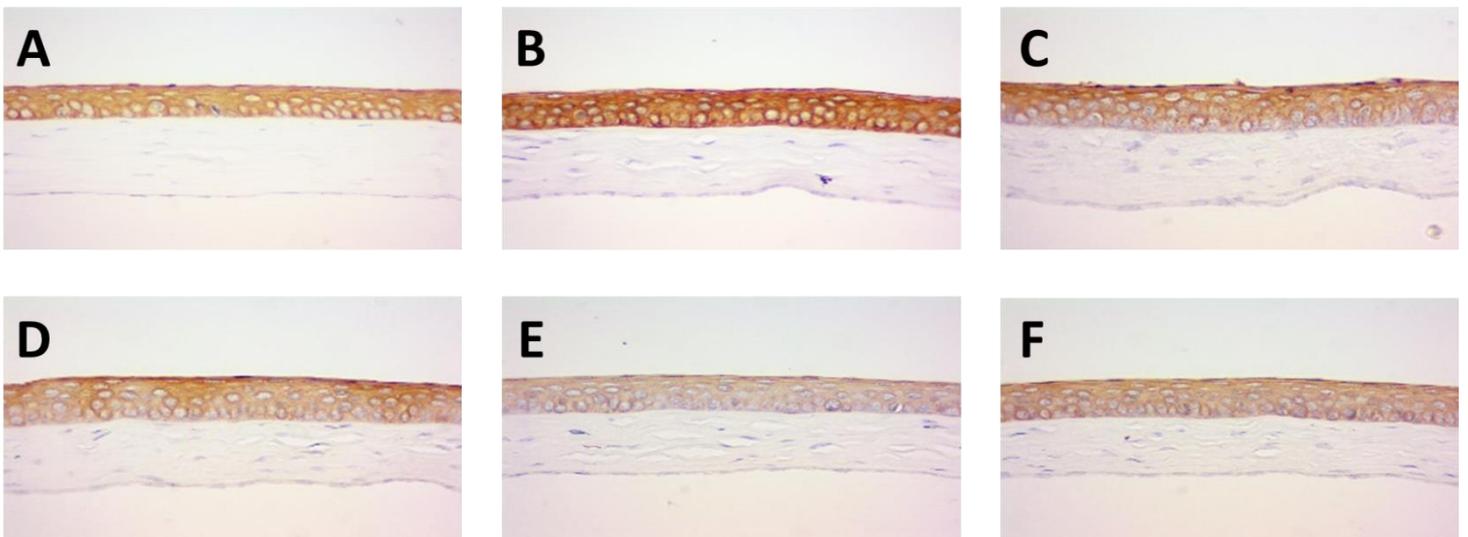


▲圖 4-3. 角膜 IHC 抗體染色法(NFκ-B)。A : Blank ; B : Damage ; C : GC 10 mg/kg ; D : GC 100 mg/kg ; E : GC 300 mg/kg ; F : GC 500 mg/kg 。(400X)

利用兩種發炎因子抗體 COX-2 與 NFκ-B 進行免疫組織化學染色法，以探討因乾眼症所引起之角膜發炎現象，是否因攝食菊苣後有達到緩解及預防效果。根據圖 4-2 與圖 4-3，可發現實驗組相對於傷害組，其發炎現象較為緩和，尤以高濃度之組別效果較好，故推測菊苣內有成分可抑制乾眼所造成之發炎現象。



▲圖 4-4. 角膜 IHC 抗體染色法(P63)。A : Blank ; B : Damage ; C : GC 10 mg/kg ; D : GC 100 mg/kg ; E : GC 300 mg/kg ; F : GC 500 mg/kg。(400X)

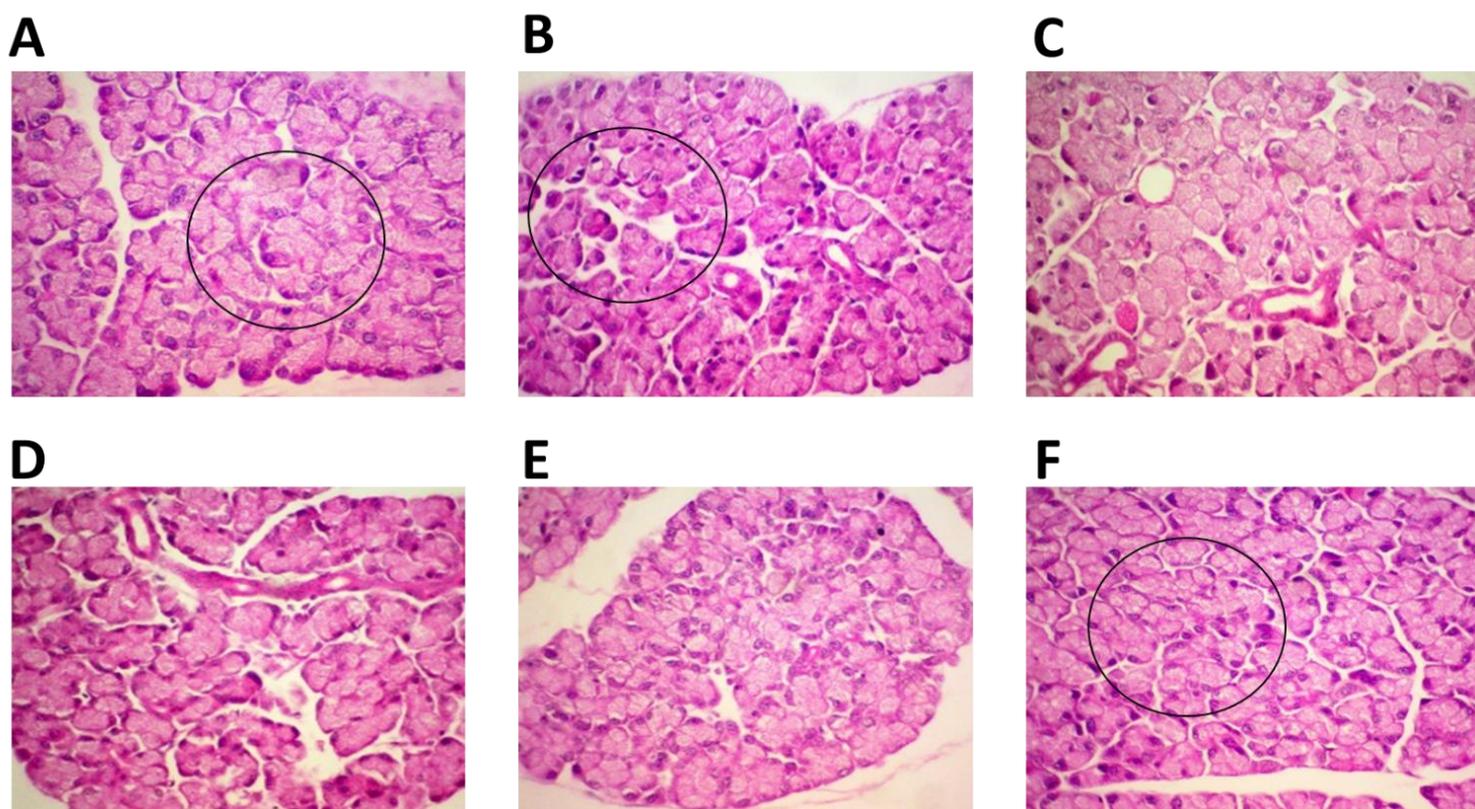


▲圖 4-5. 角膜 IHC 抗體染色法(CK 5)。A : Blank ; B : Damage ; C : GC 10 mg/kg ; D : GC 100 mg/kg ; E : GC 300 mg/kg ; F : GC 500 mg/kg。(400X)

根據圖 4-5, 發現無論是傷害組或實驗組, 細胞族群之密集度並無明顯差異, 但反觀圖 4-5, 顯示傷害組之細胞角質化非常嚴重, 但隨著實驗組濃度劑量上升, 角質化情形亦隨之減輕。

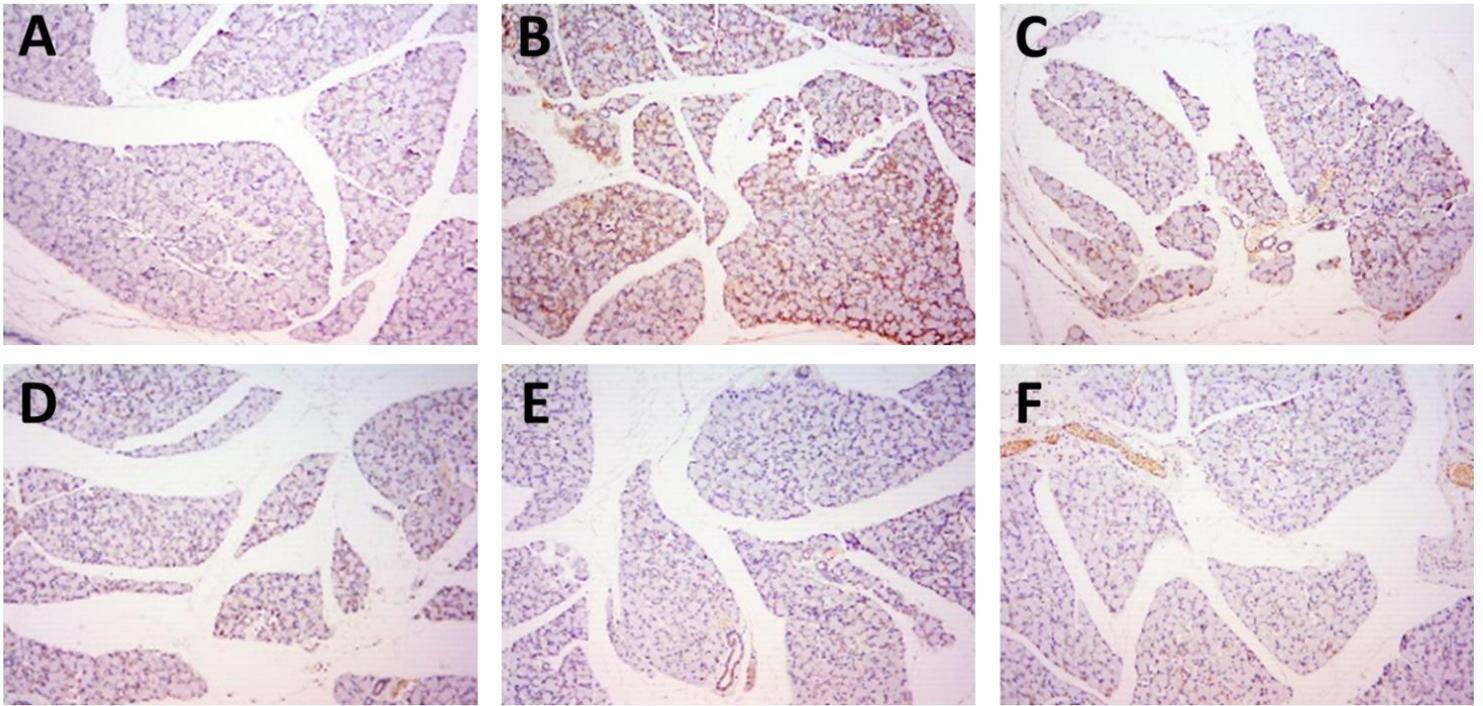
探討乾眼症，不單只有角膜的問題，分泌淚液之相關腺體亦是討論重點之一，本研究為呼應前面淚液質量之結果，進行淚腺體：外淚腺、麥氏管與哈氏線三種腺體之相關組織切片分析，將於下面列出結果。

<E> 淚腺體染色 (Lacrimal Staining)

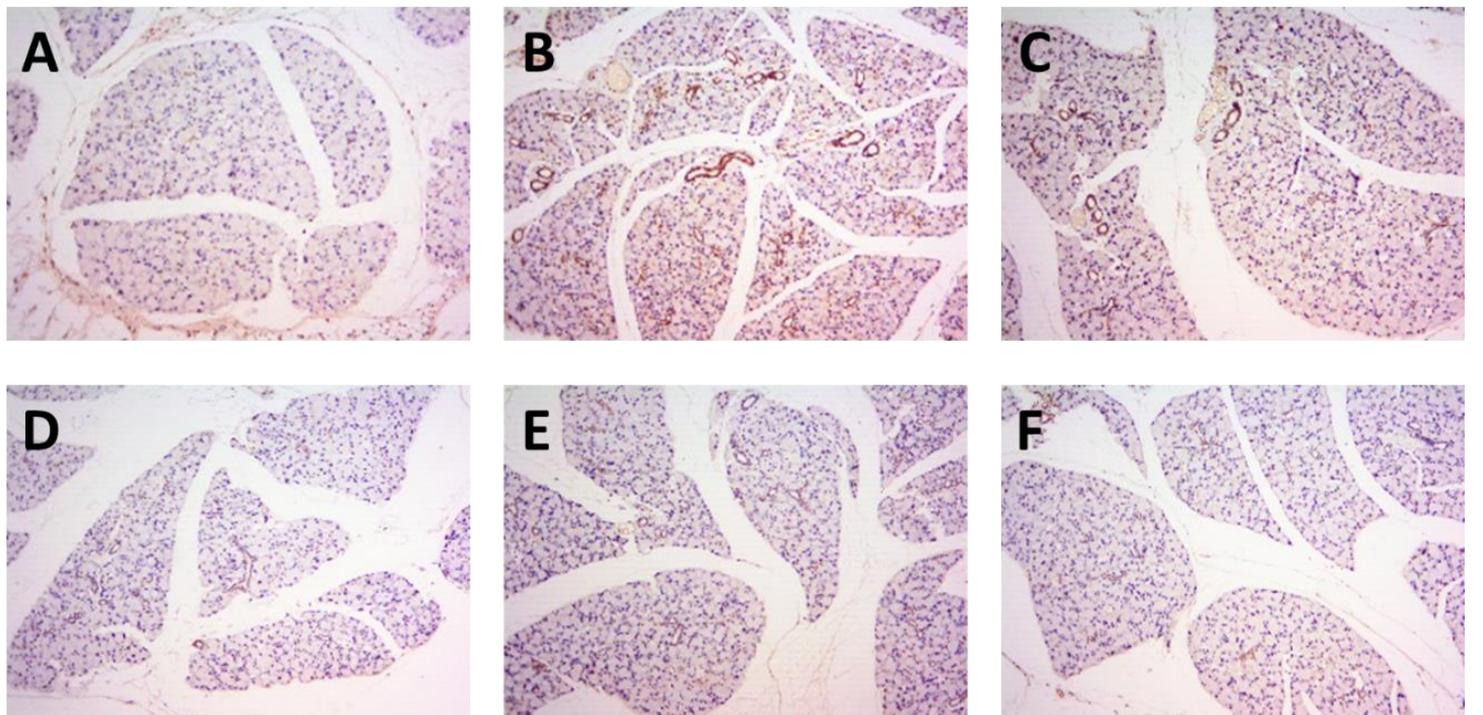


▲圖 5-1. 外淚腺蘇木紫－伊紅染色法 (H. E. Stain)。A : Blank ; B : Damage ; C : GC 10 mg/kg ; D : GC 100 mg/kg ; E : GC 300 mg/kg ; F : GC 500 mg/kg。(400X)

淚液分為三層，其中之水液層主要是由外淚腺所分泌，透過紫外線照射眼表致使產生乾眼症狀，是否會影響分泌腺體之功能運作？根據圖 5-1，發現控制組之細胞較為圓潤飽滿，傷害組則相較於萎縮乾癟，且透過染色可發現，傷害組之纖維部分較控制組多，顯示紫外線照射間接影響外淚腺，致使其產生纖維細胞以填補受損部分。而透過此圖，亦可發現 GC 500 mg/kg 之情況接近控制組，顯示菊苣不僅僅是作用在角膜，在淚液之水液層分泌腺體上亦有作用。

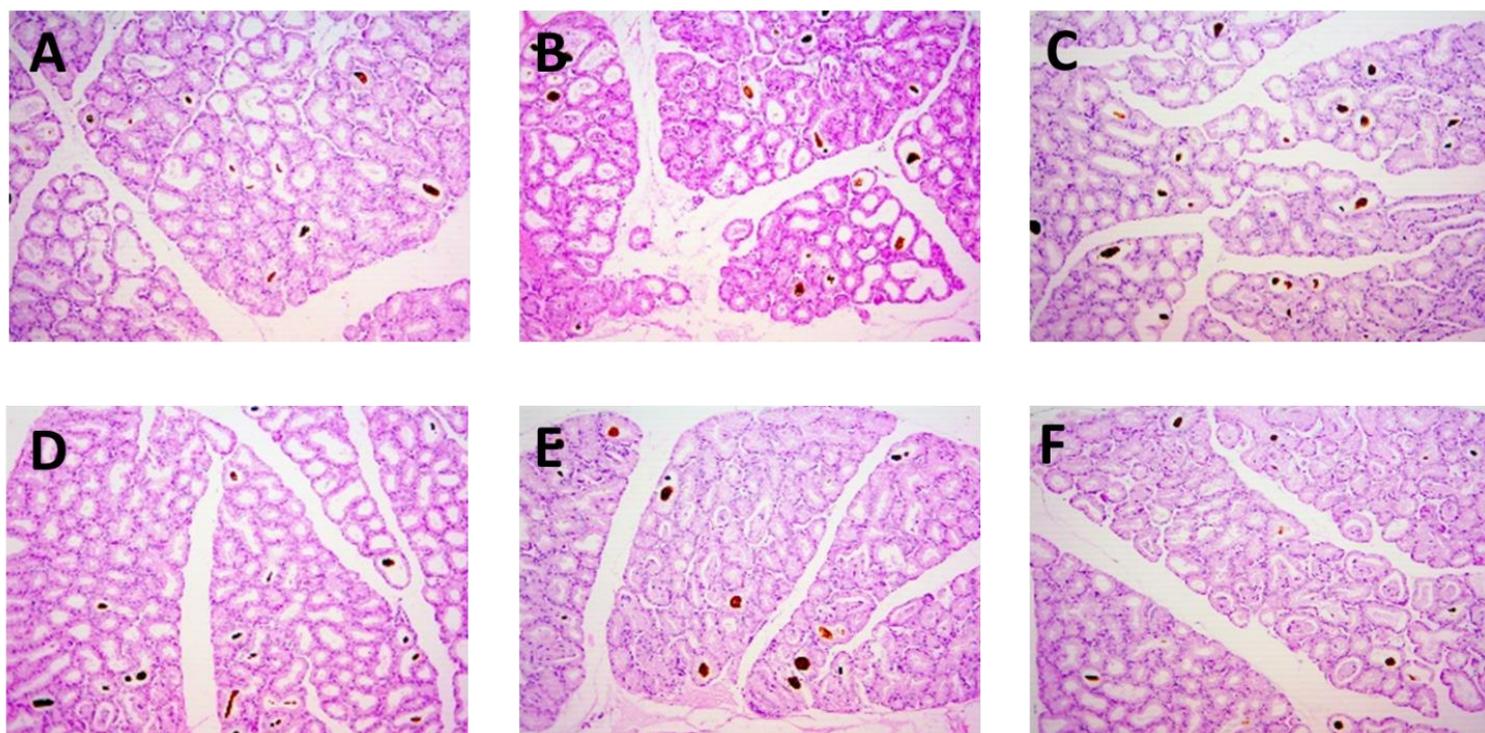


▲圖 5-2. 外淚腺 IHC 抗體染色法 (COX-2)。A : Blank ; B : Damage ; C : GC 10 mg/kg ; D : GC 100 mg/kg ; E : GC 300 mg/kg ; F : GC 500 mg/kg 。(100X)



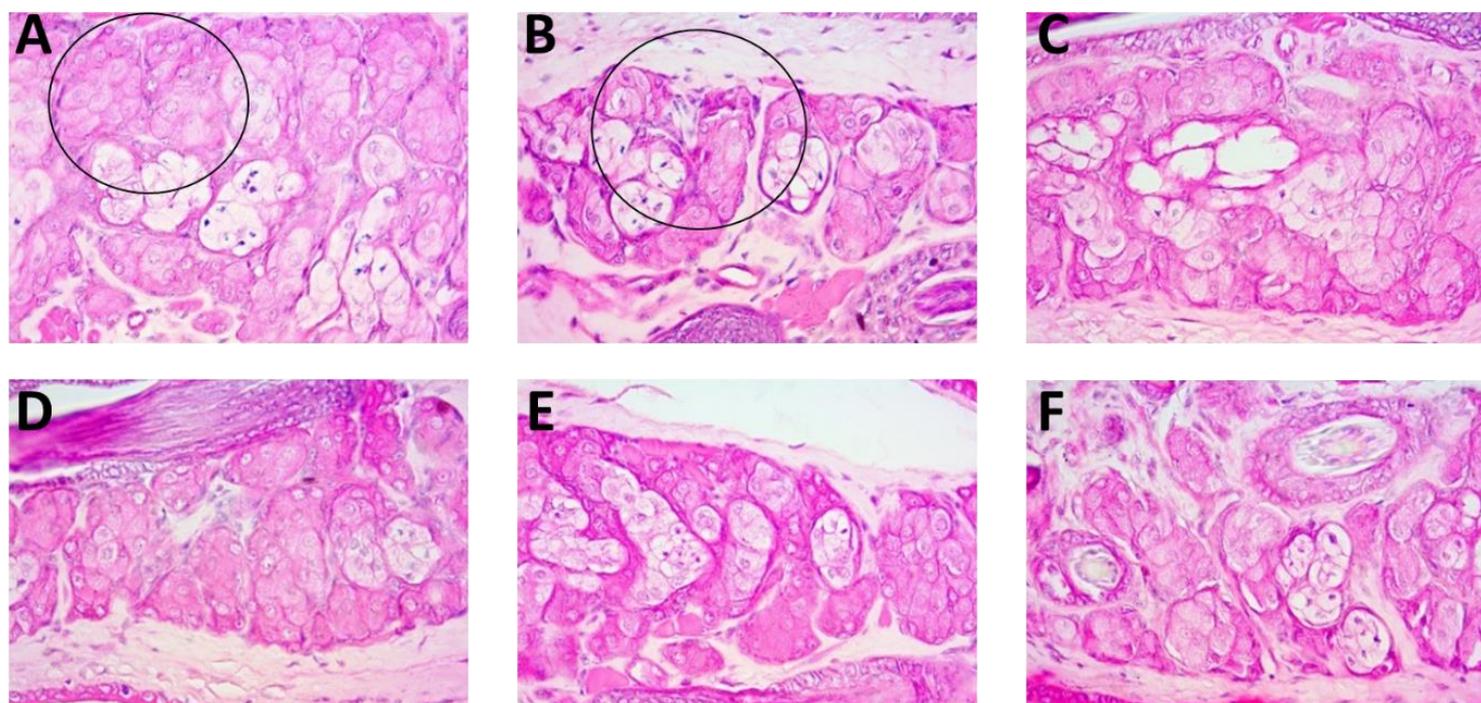
▲圖 5-3. 外淚腺 IHC 抗體染色法 (NFκ-B)。A : Blank ; B : Damage ; C : GC 10 mg/kg ; D : GC 100 mg/kg ; E : GC 300 mg/kg ; F : GC 500 mg/kg 。(100X)

根據圖 5-2 及 5-3，利用 IHC 抗體染色 COX-2 與 NF κ -B 兩種抗體去檢驗外淚腺，發現傷害組有嚴重發炎現象，直接說明紫外線照射眼表亦會影響分泌腺體之運作，而隨著實驗組濃度上升，情形趨於緩和。



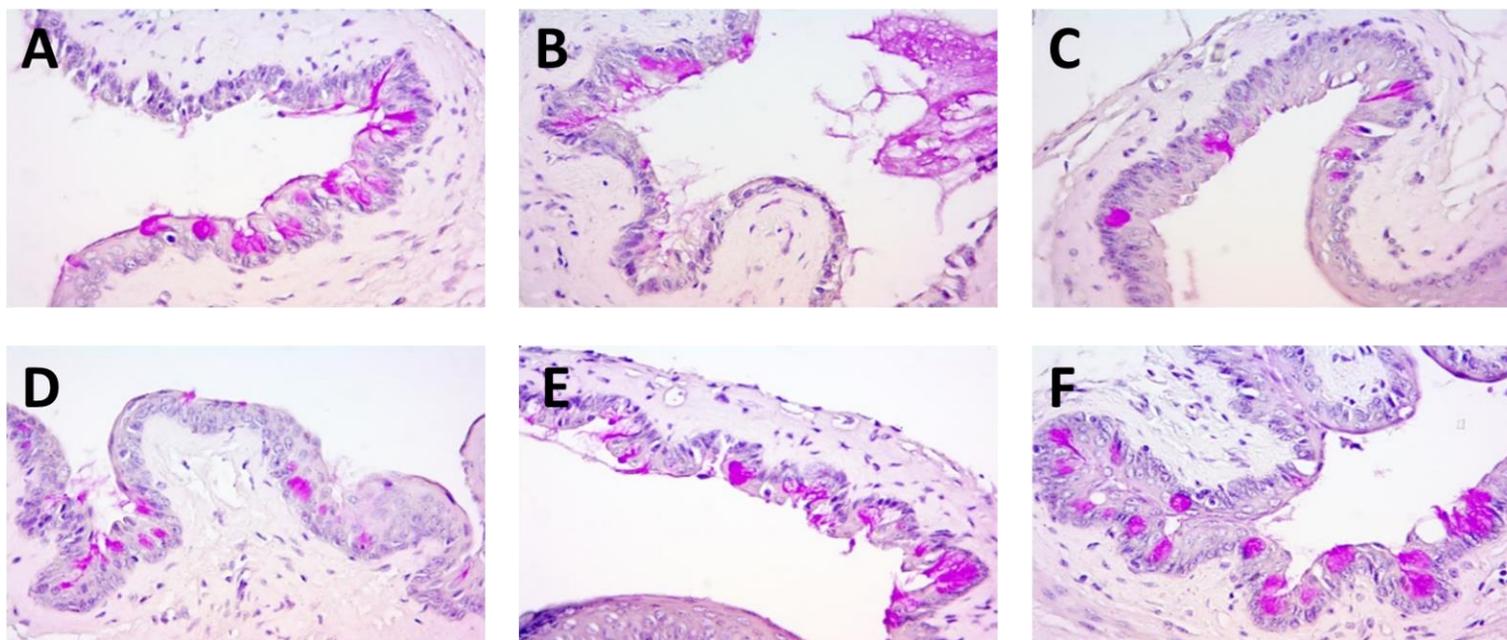
▲圖 5-4. 哈氏腺蘇木紫—伊紅染色法 (H.E. Stain)。A: Blank; B: Damage; C: GC 10 mg/kg; D: GC 100 mg/kg; E: GC 300 mg/kg; F: GC 500 mg/kg。(100X)

哈氏腺在本研究裡，各組別並無太大差異，其本身亦無掌控淚液三層之一，經追查相關文獻發現，哈氏腺與免疫反應有相關聯，在本研究中探討乾眼症之相關症狀並無直接關聯，但在此依然列出其形態系列結果。



▲圖 5-5. 麥氏管蘇木紫－伊紅染色法 (H. E. Stain)。A : Blank ; B : Damage ; C : GC 10 mg/kg ; D : GC 100 mg/kg ; E : GC 300 mg/kg ; F : GC 500 mg/kg。(400X)

麥氏管係掌控淚液中之油脂層，以防止水液層過度揮發。根據圖 5-5，可發現麥氏管經紫外線照射仍會受到損傷，控制組之囊泡相較於傷害組，較顯得圓潤飽滿，傷害組則略有萎縮，實驗組四組部分則在濃度 100 mg/kg 以上較佳。



▲圖 5-6. 結膜杯狀細胞多醣染色法 (PAS Stain)。A : Blank ; B : Damage ; C : GC 10 mg/kg ; D : GC 100 mg/kg ; E : GC 300 mg/kg ; F : GC 500 mg/kg。(400X)

結膜杯狀細胞主司淚液層之黏多醣層，分泌黏液以保持眼球表面濕潤。根據圖 5-6，紫紅色顆粒即為杯狀細胞，傷害組之杯狀細胞其結構已變為鬆散，顆粒數亦無控制組多，而實驗組四組中，尤以高濃度 GC 500 mg/kg 之杯狀細胞型態完整且數量密集，此結果可呼應先前淚液膜破裂時間之結論。

(六) 討論

綜合上述結果，在小鼠犧牲前之數據顯示，可初步推論菊苣應用於預防乾眼症上有一定之功效，其中，又可推定有效劑量約落在 100 mg/kg 至 500 mg/kg 之間，而以此作為基礎再加上組織切片及染色之數據，可推論在本研究中，以 500 mg/kg 為最有效劑量。在角膜 IHC 抗體染色部分，菊苣對發炎因子之緩解確定有其一定之效用，其中之有效成分將會是後續研究重點。而在腺體 IHC 抗體染色部分，本研究確定眼睛在經過紫外線照射後能使外淚腺與麥氏管產生發炎作用，進而影響淚液之分泌與品質，透過染色結果，菊苣亦可緩解淚腺體之發炎反應，其中有效劑量為 300 mg/kg 以上，而再根據結膜杯狀細胞利用 PAS 染色法可推論，菊苣可促進多醣體之分泌以補足黏多醣層來保持眼球濕潤，而有效劑量來到了 500 mg/kg。根據本研究，菊苣在緩解乾眼症狀上是有效的，而推薦劑量為 500 mg/kg，希望此研究能對視覺保健及開發護眼產品有微薄貢獻，而本計畫雖在此結案，但後續之相關研究將不會停止，探討面相將從角膜與淚腺體的分析，轉向淚液成分分析及菊苣在乾眼症上之相關運作機轉。

本研究繼 104 年 10 月於馬來西亞吉隆坡的亞太視光研討會(APOC; Asia Pacific Optometry Conference)上發表後，於今年 106 年 3 月份於國防醫學大學生物醫學年度大會上發表壁報論文，亦獲得迴響。





Dietary intake of *Cichorium intybus* ameliorates lacrimal secretion impairment in a mouse dry eye model



Tsung-Han Lu¹, Chih-Ying Wu², Chi-Chun Lee³, Yuan-Yuan Lin³, Yu-Wen Kao³, King-Rong Wang¹, Han-Hsin Chang⁴, David Pei-Cheng Lin²

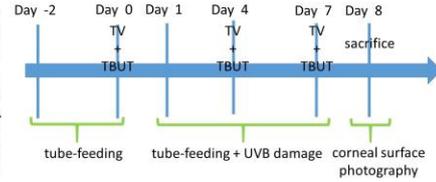
- (1) Department of Psychology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan
 - (2) Department of Medical Laboratory and Biotechnology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan
 - (3) Department of Medical Imaging and Radiological Sciences, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan
 - (4) Department of Nutrition, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan
- Correspondence Author: David Pei-Cheng Lin. Email: pcl@csmu.edu.tw

Purpose:

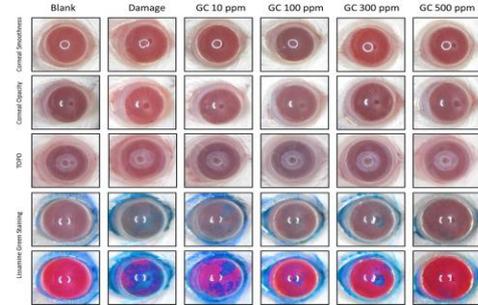
Cichorium intybus is native in Europe and was later transported to China for use as a herb medicine. Ancient Chinese medicine literature indicated that it may help in ameliorating eye illness. Knowledge of folk medicine suggests its use for alleviation of glaucoma and cataract formation. As such, *Cichorium intybus* has been used for hundreds of years as a vision care material, but without scientific evidence to support such claim. Previously, we have shown that preparatory procedures could affect its efficacy for alleviation of dry eye conditions. In the present study, we investigated its effective dietary intake dose and unveil its underlying mechanism for dry eye alleviation.

Materials and Methods:

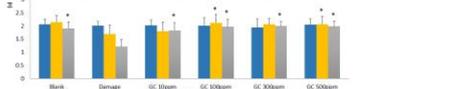
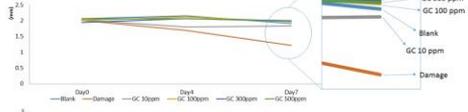
The feeding material prepared from *Cichorium intybus* was coded 'GC' in this study. The mouse dry eye model was induced by UVB irradiation. Female ICR mice at 6 weeks of age were randomly allocated into 6 groups: (1) blank, (2) UVB damage (UVB + 0.9% NaCl), (3) GC at 10 ppm (UVB + GC formula at 10 ppm), (4) GC 100 ppm (UVB + GC formula at 100 ppm), (5) GC 300 ppm (UVB + GC formula at 300 ppm), (6) GC 500 ppm (UVB + GC formula at 500 ppm). The daily feeding was started on Day -2 before damage and was continued for 11 days. On Days 0, 4, and 7, Tear Volume (TV) and Tear Break Up Time (TBUT) were assessed. On day 8, cornea smoothness, opacity, topography, and lissamine green stain were performed and recorded before sacrifice. The eye samples were collected for histological and immunohistological analyses.



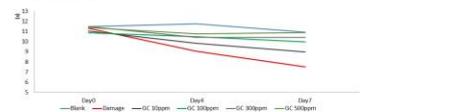
Results:



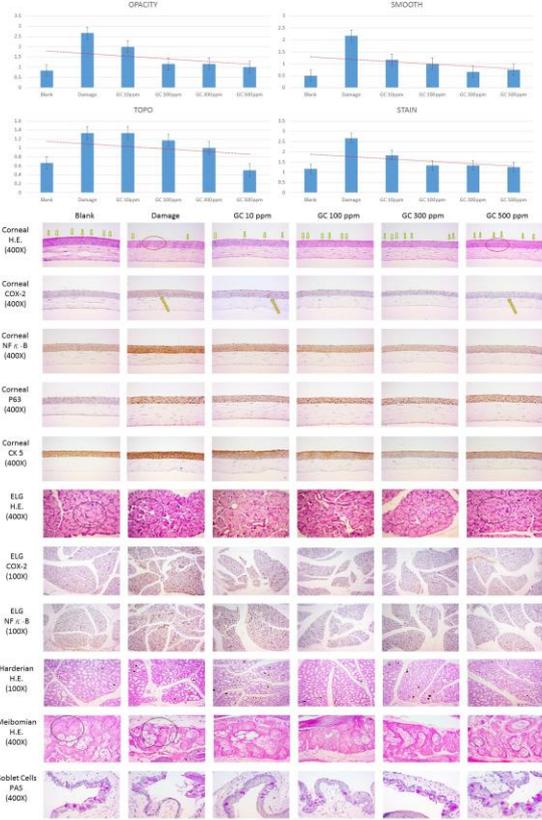
▲ Cornea Surface Photography



▲ Tear volume



▲ Tear Break Up Time



▲ IHC photography

Discussion: The present study demonstrated that the effective dose is at 100 ppm or above. Immunohistological results indicated that dietary intake of *Cichorium intybus* preparations helped to repair cornea damages caused by UVB irradiation through mitigation of inflammatory activities in the extraocular gland and Harderian gland. Conjunctival goblet cells were well-protected with high dose intake of *Cichorium intybus* preparations, particularly at 300 ppm and 500 ppm doses. The effective ingredients were currently under investigation.

This study was supported by an undergraduate studentship from Ministry and Science and Technology, R.O.C. (Grant number: MOST 105-2815-C-040-030-B)

(六) 參考文獻

1. 臺大醫院眼科部
2. Orphanet J Rare Dis. 2009; 4: 7.
3. Korean J Ophthalmol. 2007 December; 21(4): 251 - 254.
4. Mol Cell Biol. 2007 January; 27(1): 182 - 194
5. Xiao B, Wang Y, Reinach PS, Ren Y, Li J, Hua S, et al. (2015) Dynamic Ocular Surface and Lacrimal Gland Changes Induced in Experimental Murine Dry Eye. PLoS ONE 10(1): e0115333. doi:10.1371/journal.pone.0115333
6. Niko L. Setälä, Jari Metso, Matti Jauhiainen, Antti Sajantila, and Juha M. Holopainen: Dry Eye Symptoms Are Increased in Mice Deficient in Phospholipid Transfer Protein (PLTP) The American Journal of Pathology, Vol. 178, No. 5, May 2011.
7. Setälä NL, Metso J, Jauhiainen M, Sajantila A, Holopainen JM. Dry eye symptoms are increased in mice deficient in phospholipid transfer protein(PLTP). 2011May;178(5):2058-65. doi:10.1016/j.ajpath.2011.01.027.
8. Christopher D. Conrady, Zachary P. Joos, and Bhupendra C. K. Patel Review: The Lacrimal Gland and Its Role in Dry Eye, Hindawi Publishing Corporation Journal of Ophthalmology Volume 2016, Article ID 7542929, 11 pages
9. 眼解剖生理學 曾廣文等合著 華格納企業
10. Majji AB, Cao J, Chang KY, Hayashi A, Aggarwal S, Grebe RR, De Juan E Jr; Age-related retinal pigment epithelium and Bruch's membrane degeneration in senescence-accelerated mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000 Nov;41(12):3936-42.
11. Gulati, Shilpa, and Sandeep Jain. "Ocular Pharmacology of Tear Film, Dry Eye, and Allergic Conjunctivitis." (2016): 1-22.
12. Erich Knop, 1 Nadja Knop, 1 Thomas Millar, 2 Hiroto Obata, 3 and David A. Sullivan 4, 5 The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Subcommittee on Anatomy, Physiology, and Pathophysiology of the Meibomian Gland, DOI:10.1167/iovs.10-6997c 1938 Investigative Ophthalmology & Visual Science, Special Issue 2011, Vol. 52, No. 4