

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計畫名稱：眼藥水常用防腐劑四級銨(BAC)誘發之乾眼症分析以及  
\* 中草藥對角膜發炎的緩解功效測試 \*  
\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 戴正倫  
學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-040-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： 張菡馨

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： 中山醫學大學營養學系（所）

中華民國 106年03月29日

# 眼藥水常用防腐劑四級銨(BAC)誘發之乾眼症分析以及中草

## 藥對角膜發炎的緩解功效測試

### 一. 摘要

現代人使用電腦及手機顯示器的時間愈來愈多，長時間使用後，若經常發生不自覺的眨眼，眼睛常覺得乾澀、紅腫疼痛、有異物感等現象，很可能便是乾眼的症狀。然而當我們去看醫生時，拿到人工淚液或是眼藥水，這些液體為了能延長保存期限，往往內含常用的防腐劑成分氯化苯二甲烴銨(BAC)。過去研究已知道 BAC 會造成眼表發炎、眼睛敏感度下降、淚液分泌量下降等現象，也可能進一步引發更嚴重的乾眼症。因此本計畫擬利用中草藥研究針對 BAC 所誘導之角膜發炎的緩解功效及其修復分析。本研究使用 ICR 小鼠為實驗動物，在使用 BAC 傷害前先給予三天的餵食，之後連續十天同時餵食並給予傷害。過程中測驗包括：淚液變化量(Tear production)、淚液膜破裂時間(TBUT)，及最終的眼表傷害拍照。經由動物實驗測試結果顯示，無論在淚液量、淚液品質、角膜平滑度等結果都表示中藥草對於 BAC 造成傷害有所減緩。之後進行組織切片分析，使用 HE 染色觀察細胞型態，並且以 PAS 染色觀察穹隆結膜內的杯狀細胞，再以免疫組織化學染色(IHC stain)及西方墨點法(Western blot)檢測 BAC 引發的發炎症狀以及角膜的修復狀況，再利用 TUNEL 觀察細胞凋亡的狀況，結果發現因受傷而減少的角膜上皮細胞有明顯的修復現象，且角膜上的發炎因子表現情形有改善。本研究計畫結果證實中藥草對於 BAC 引發的角膜發炎及受損情形有明顯的預防及修復效果。

關鍵字：氯化苯二甲烴銨(BAC)、角膜、發炎、乾眼症

### 二. 研究動機與研究問題：

在現代醫學中，對於乾眼症尚未有可以痊癒的方法，只是試圖在減緩其再度惡化。乾眼症是由於淚水不易附著眼表面，產生嚴重的乾眼症狀，導致畏光、無法睜開眼睛，及眼睛紅腫等症狀。主要的治療方法便是保持眼表的濕潤，因此常利用人工淚液包含藥水、藥膏、凝膠，但這些藥物不能長期保存，常會有細菌及病原微生物在裡頭生長，因而加入防腐劑氯化苯二甲烴銨(BAC) [1]，此化學物質便是常使用在眼藥水中的清潔劑與防腐劑，然而據許多的資料顯示 BAC 反而會形成眼表更嚴重的發炎反應，最直接影響角膜上皮細胞受損[2]，分泌淚液的品質大幅下降，不但沒減緩乾眼症的病情，還變得更加嚴重，點眼藥水雖然可以減緩一下子，過不久又會開始不舒服，甚至開始覺得

更加乾澀、容易疲倦、想睡、會癢、有異物感、灼熱感，眼皮緊繃沉重、分泌物黏稠，怕風、畏光，對外界刺激很敏感，有時眼睛太乾、基本淚液不足反而刺激反射性淚液分泌而造成常常流眼淚之症狀[3]；較嚴重者眼睛會紅、腫、充血、角質化，角膜上皮破皮而有絲狀物黏附，長期之傷害則會造成角結膜病變，並會影響視力，是屬於一種治標不治本的方法。

本次計畫利用中藥草針對眼表發炎狀況來測試是否對於眼表的傷害修復狀況有幫助，及其對角膜上的發炎症狀減緩與修復受損細胞的機制為何。

### 三. 文獻回顧與探討：

#### A. 角膜發炎：

角膜發炎[4]是導致乾眼症的原因也是結果，並且是惡性循環的關鍵作用。乾眼症亦稱乾燥性角結膜炎，是在當眼睛的角膜和結膜處於非常乾燥時，由於眼淚異常，而導致損害眼睛的表面。

角膜直接與外界接觸，受到損傷及感染的機會較多，角膜本身沒有血管組織，其營養主要由角膜周邊血管網、淚水的供應，氧氣則由大氣中的氧氣溶在淚液中供給，因此白血球等抗發炎的細胞不容易進入角膜，因此一旦有異物入侵就容易產生感染的機會，且病程長、恢復緩慢。角膜透明特性是需要角膜的上皮和內皮細胞的完整無缺才可保持，一旦角膜發炎造成上皮或是內皮的損傷，就會使角膜失去透明度進而影響視覺。

#### B. 乾眼症：

乾眼症是由於眼球表面缺乏淚液所引起的疾病，是一種相當常見的疾病。隨著科技的進步對電腦使用率及手機的依賴，不正當的過度使用眼睛，不知不覺造成淚液的量及品質下降，乾澀的感覺尤其以下午或晚上特別明顯，嚴重的患者會有眼皮粘連睜不開的現象。

現在目前治療乾眼症不外乎人工淚液[5]、自體血清、抗發炎療法，但主要還是需要靠改變錯誤的生活習慣。正常的眼睛有一層很薄的淚液膜覆蓋在角膜和結膜之前，若因不當使用眼睛，使得角膜上皮細胞不正常的凋亡，原本位於眼表光滑的淚液膜呈現不均勻甚至蒸發乾，或是淚液膜中任意一層出了狀況，造成發炎狀況稱為乾眼症。

常見乾眼症可分為兩大類：水性不足型乾眼症，由於與淚腺問題；或蒸發型乾眼症[6]，通常是由於與瞼板腺的問題。症狀包括燒灼感、癢、砂礫和異物感的眼睛，經常紅腫和發炎。

### C. 乾眼症產生原因：

a. 淚水分泌減少：淚液分泌本來就會因為年紀下降，尤其停經後的婦女常常因為荷爾蒙減少而降低淚水分泌，原發和老化性淚液不足引起的乾眼症，經常也引發口乾症，稱為謝格爾氏症候群[7]。另外某些原發性淚腺缺乏[8]或次發性的淋巴瘤、愛滋病、移植抗寄生疾病等自體免疫疾病、血液疾病、維生素A缺乏、慢性結膜炎或眼瞼炎、砂眼、外傷、化學性灼傷、放射線治療等會導致淚腺分泌減少。

b. 淚液過度蒸發和分不負均勻：淚液蒸發太快，導致淚液量減少和高滲透壓如油脂腺功能異常、眼瞼炎、熬夜、用眼過度、營養失調等可能造成油脂層分泌不足[9]或長時間在冷氣房或戶外強風燥熱之工作環境、長時間專心開車、一直盯著看電視、打電腦而減少眨眼次數、眼瞼外翻或眼瞼閉合不全等異常，甚至是結膜結痂或手術傷害導致杯狀細胞受損，化學藥品灼傷或是長期配戴隱形眼鏡引起過敏發炎或異物引發外傷得淚液穩定失衡，增加蒸發速度。

### D. 淚液層：

淚液主要是覆蓋在眼角膜及結膜上，形成一個潤滑保護膜，經由眨眼的動作而均勻分布，不僅能提供角膜上皮細胞所需的氧氣，提供眼球平滑的光學表面，潤滑角膜及眼瞼內面，防止眼球表面的乾燥並幫助眼睛表面異物雜質的排除。

淚液分成：黏液層、水層、脂質層

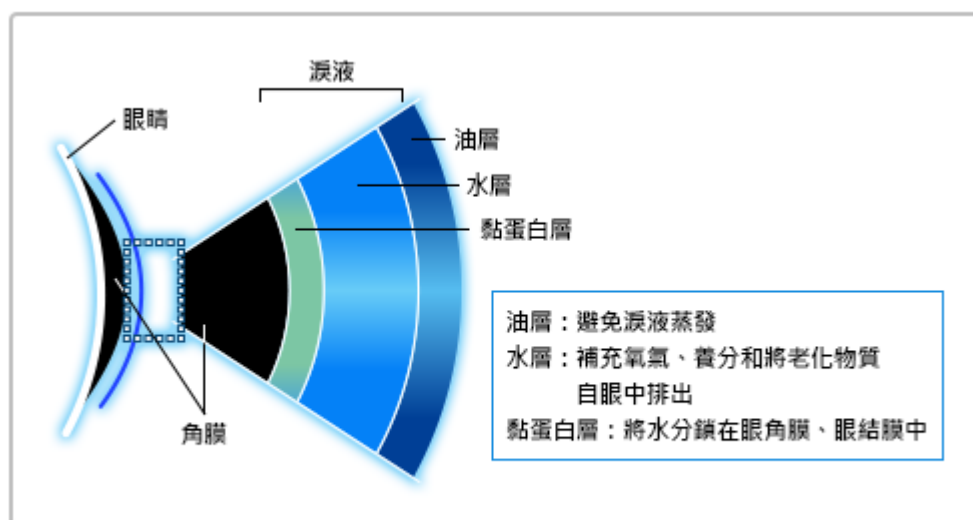


圖1

來源：[http://smile.lion-corp.com.tw/page2\\_2.html](http://smile.lion-corp.com.tw/page2_2.html)

- a. 黏液層：由結膜杯狀細胞所分泌，它改變了原本的疏水性轉換成親水性，在角膜表面形成光滑表面，讓淚液均勻附著，當視力時而清楚時而模糊時，常是黏膜分泌不正常導致。飲食方面可補充含大量維生素 A，如：蕃茄、紅蘿蔔、木瓜、魚、牛奶。
- b. 水層：由淚腺、副淚腺分泌，占了淚液大部分，提供眼睛光滑清晰的表面，並且提供角膜細胞氧氣，內含抗菌[10]、代謝作用。處於乾燥的環境眼睛會極度酸澀，如果是在初期，反而會刺激淚腺流出大量眼淚，因此會有間歇性淚濕眼眶的情形，長期則導致嚴重缺水性乾眼症。
- c. 脂質層：在上、下眼瞼有數十個皮脂腺負責油脂的分泌，它有潤滑及防止淚水蒸發的功能，若不正常作息，很可能壓抑皮脂腺的正常分泌，導致皮脂過度濃稠，易堵住皮脂腺開口，造成皮脂腺發炎。

#### E. BAC：

全名為 Benzalkonium chloride(BZK, BKC, BAC)，中文名稱為“氯化苯二甲煙銨，當純度高時為無色，易溶於乙醇和丙酮，具淡淡的苦杏仁味，水溶液應為中性至微鹼性，易產生泡沫，是一種陽離子表面活性劑，屬非氧化性殺菌劑，高效的殺菌滅藻能力，同時具有一定的去油、除臭能力和緩蝕作用，能改變細菌胞漿膜通透性，使菌體胞漿物質外滲，阻礙其代謝而起殺滅作用對革蘭氏陽性細菌作用較強，對綠膿桿菌、抗酸桿菌細菌芽孢無效。常用於手術前皮膚消毒、粘膜和傷口消毒，手術器械消毒。BAC 亦可作為紡織印染行業的殺菌防霉劑及柔軟劑、抗靜電劑、乳化劑、調理劑等。

BAC 常用於眼藥水中，然而當青光眼、乾眼、感染和虹膜炎的病人使用含 BAC 的眼藥水次數太多或時間太長易造成損害。



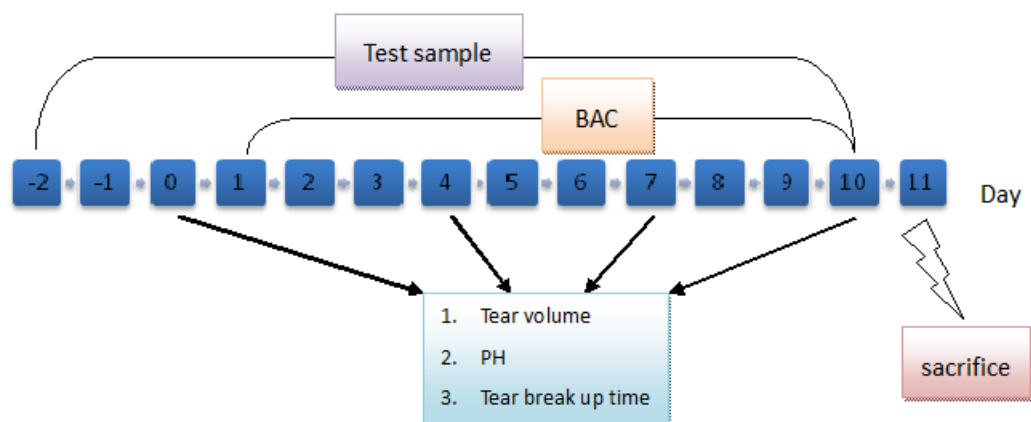
#### 四. 研究方法與步驟：

##### A. 飼育過程

實驗動物選定為樂斯科公司 ICR 母鼠，這些小鼠源自於瑞士 Centre Anticancereux Romand 實驗室的非近交品系。

小鼠飼養在平底盒籠，每個籠子飼養三隻小鼠。盒籠內放置木屑墊料提供小鼠溫暖。動物房保持室溫  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相對溼度 30~70% 之間。光照時間為 12 小時明暗週期。平底盒籠每週更換清洗一至三次，並更換新墊料。

##### B. 實驗流程



實驗共十四天，開始前三天始投藥做為預防措施，之後連續十天投藥與給予 BAC 傷害誘導乾眼症狀，最後一天犧牲。

分別在實驗流程圖中的第零天、第四天、第七天、以及第十天測量淚液量(Tear volume)、PH 值、淚液膜破裂時間(Tear break-up time)，第十四天犧牲前，拍攝眼表照片，包含眼表平滑度(Surface smoothness)、透明度(opacity)、地圖儀(topography)、和染色(Lissamine green stain)。

## C. 實驗材料及處理

### 後續流程圖：

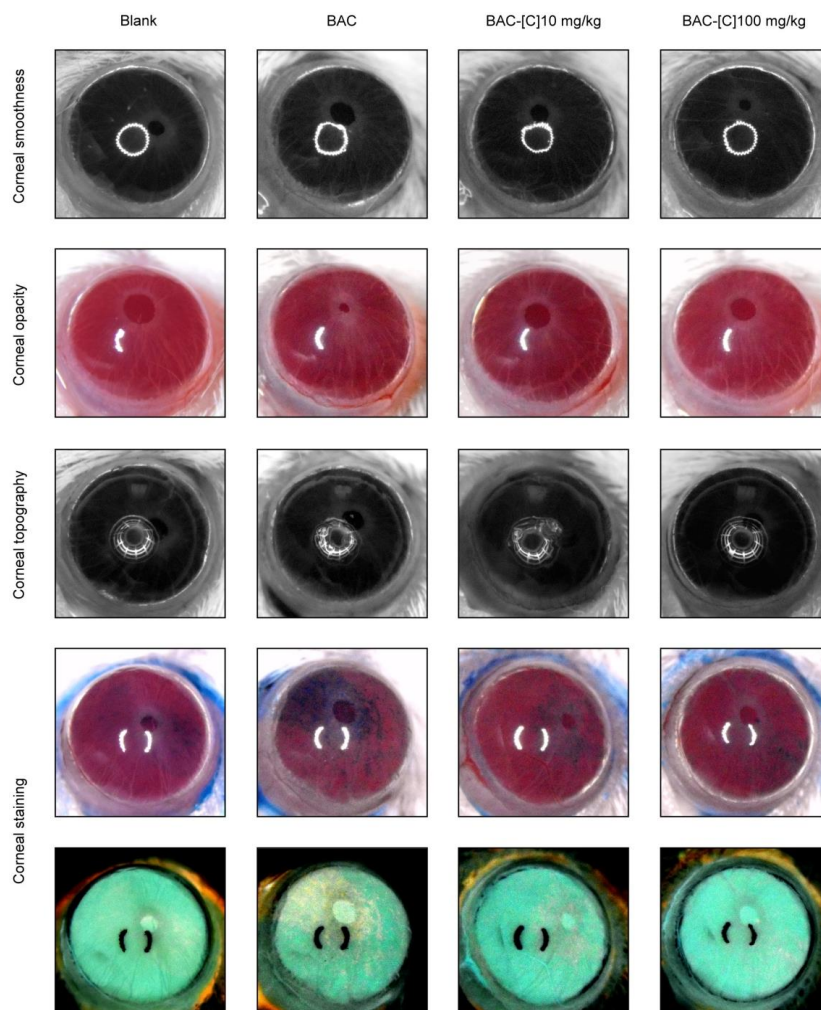


## 五. 結果：

### A. 結果：

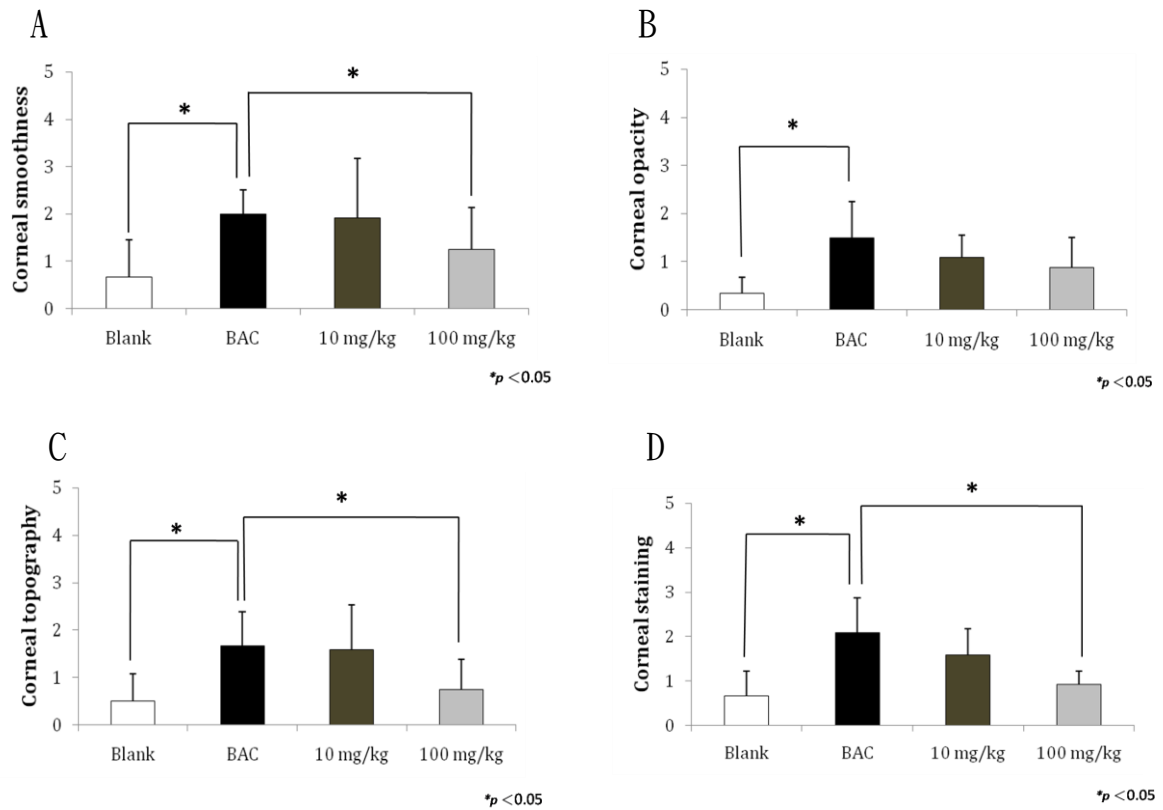
#### a. 眼球表面拍照結果

經由 BAC 傷害後，會使得角膜上皮細胞受損及發炎，進而影響到眼球表面的情形，在眼表平滑度中，角膜上的光圈若是越接近圓形代表平滑度越好，分數越低；透明度中，若角膜呈現越清晰透明，代表透明度越好，分數越低；地圖儀中，同心圓越完整，代表角膜越平滑(相較於眼表平滑度範圍更廣)，分數越低；在染色中；若無殘留任何染劑，代表角膜無受到傷害，分數越低。在實驗中眼表平滑度、地圖儀和染色測驗可以發現，BAC 誘發的組別眼睛表面不平整且有明顯損傷(如圖一之一 Coneral smoothness、Coneral topography、Coneral staining)，而在高劑量組別則有明顯的改善。角膜在受傷後同時會影響到角膜的透明度，使其變混濁(如圖一之一 BAC 的 Coneral Opacity)，而在高劑量組中也有觀察到改善的現象，且在定量結果發現無論在眼表平滑度、透明度、地圖儀和染色中，高劑量組中遠小於傷害組(如圖一之二 A, B, C, D)，可知中草藥對於眼睛表面不平整及透明度均有改善的效果。





圖一之一、Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠眼球表面拍照 (Coneral smoothness、Coneral Opacity、Coneral topography、Coneral staining)。



圖一之二、Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠角膜 Cornea smoothness(平滑度)定量結果。

Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠角膜 Cornea opacity(透明度)定量結果。

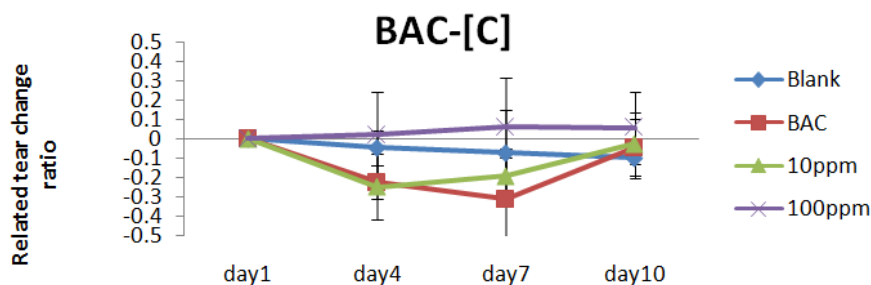
Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠角膜 Cornea topography(地圖儀)定量結果。

Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠角膜 Cornea stain(染色)定量結果。

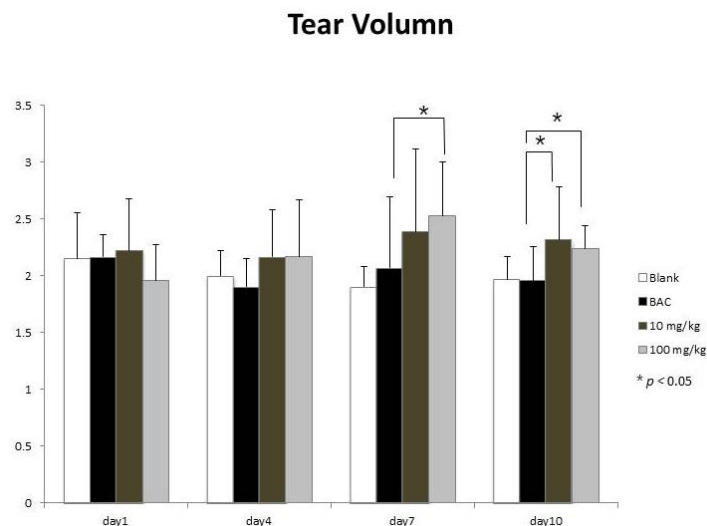
\* $p < 0.05$ , Smoothness 中 Blank 與 BAC 比較; \* $p < 0.05$ , Smoothness 中 BAC 與 100mg/kg 比較; \* $p < 0.05$ , Opacity 中 Blank 與 BAC 比較; \* $p < 0.05$ , Topography 中 Blank 與 BAC 比較; \* $p < 0.05$ , Topography 中 BAC 與 100mg/kg 比較; \* $p < 0.05$ , Stain 中 Blank 與 BAC 比較; \* $p < 0.05$ , Stain 中 BAC 與 100mg/kg 比較

## b. 淚液量測驗

導致乾眼症的原因主要是與淚液的分泌有關，文獻指出當角膜受到 BAC 傷害後，也會影響到淚腺組織，使淚液分泌產生問題。在實驗過程中利用淚液試紙放入老鼠下眼瞼中測量不同時間的淚液量，發現傷害組的淚液量在的七天有明顯的下降趨勢(如圖二之一 day7)，而高劑量組別與傷害組相比較有明顯的差別，因此可推測中草藥對於淚液分泌有顯著的效果，然而在第十天時無論是傷害組或是低劑量組淚液量都有回升的趨勢，可能與老鼠身體自我修復機制有關(如圖二之一 day10)，才導致淚液在第十天均上升，而在定量結果中(如圖二之二)，隨著天數的增加，在劑量組中淚液量明顯高於傷害組及正常組，可推論中草藥對於淚液的分泌有促進的功效。



圖二之一、Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠淚液量比例在不同天數之折線圖。

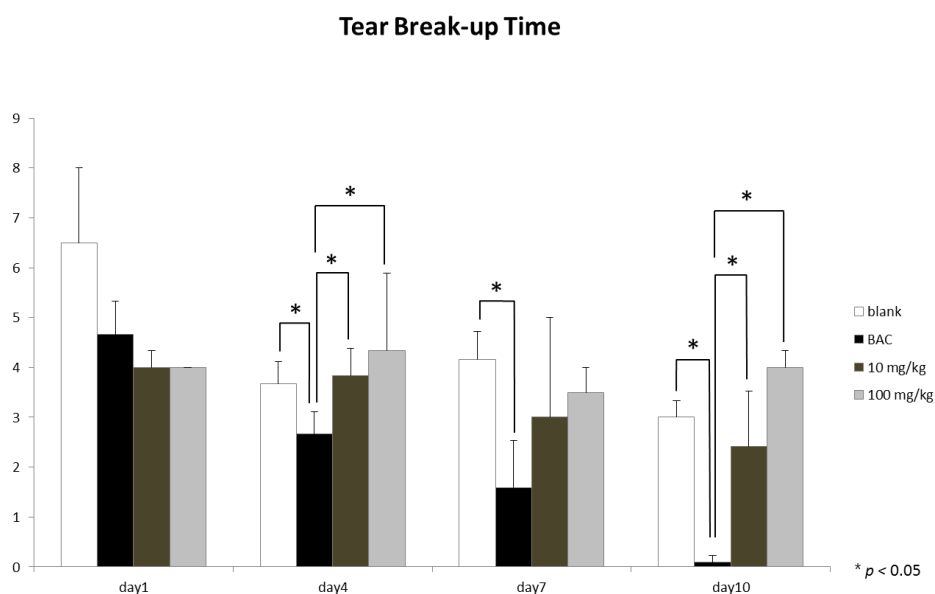


圖二之二、Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠淚液量不同天數定量分析。

\* $p < 0.05$ , day7 BAC 與 day7 100mg/kg 比較; \* $p < 0.05$ , day10 BAC 與 day10 10mg/kg 比較; \* $p < 0.05$ , day10 BAC 與 day7 100mg/kg 比較。

### c. 淚液膜破裂時間 (Tear Break-Up Time)

乾眼症狀中除了淚液量的減少，淚液品質也會有所降低，這些因素都會聯想到與淚液膜的破裂時間有關，導致淚液膜提前破裂或是無法形成完整的淚液膜。實驗中利用 green fluorescence solution 滴在老鼠眼球表面與淚液混合，當經過幾秒鐘的時間，淚液膜便開始破裂，當眼球表面越凹凸不平時，越不容易形成完整淚液膜，造成淚液膜破裂時間縮短，實驗後觀察到傷害組的淚液膜隨著天數不斷下降，最終趨近於零；在低劑量組中，淚液膜破裂時間雖然隨著天數有下降，但相較於傷害組有明顯的緩解效果，而在高劑量組中，淚液膜破裂時間與正常組相當(如圖三)，可知利用中草藥餵食後中草藥對於淚液膜破裂時間有緩解及改善的效果。

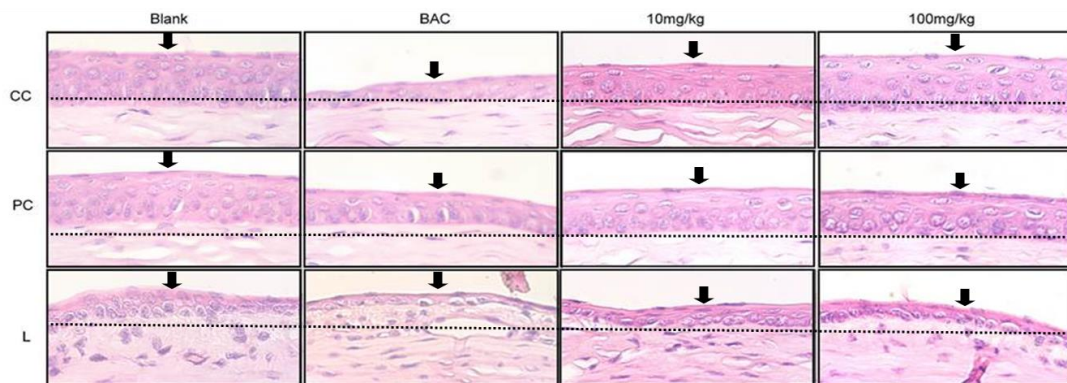


圖三、Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠淚液膜破裂時間定量結果。

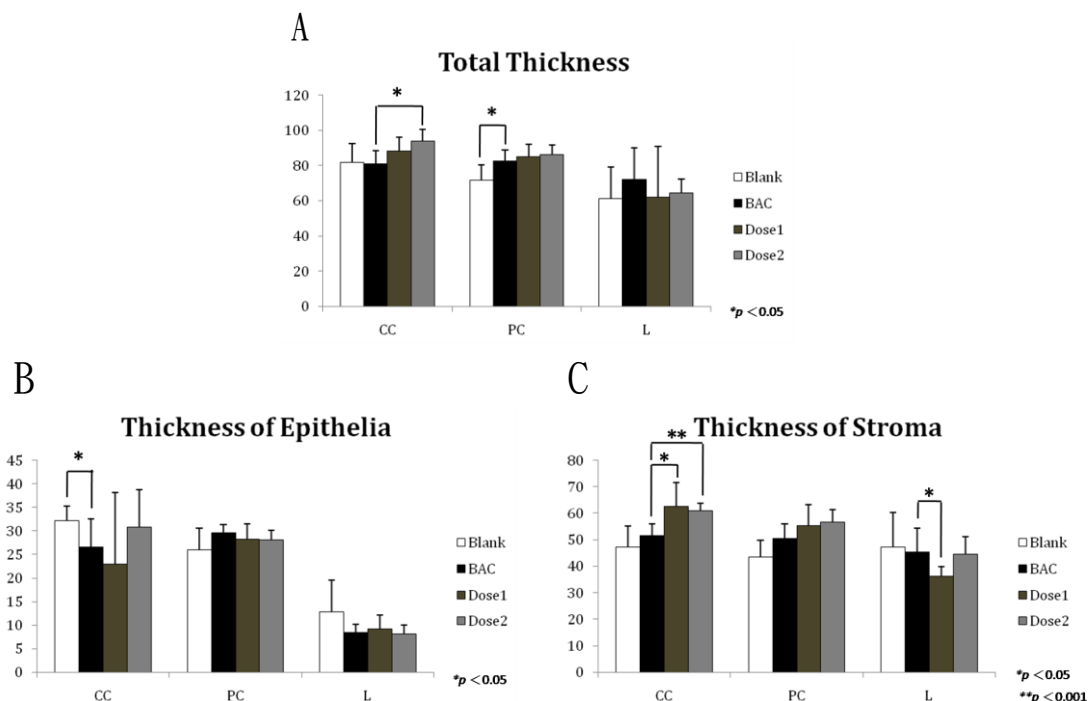
\* $p < 0.05$ , day4 blank 與 day4 BAC 比較；\* $p < 0.05$ , day4 BAC 與 day4 10mg/kg 比較；\* $p < 0.05$ , day4 BAC 與 day4 100mg/kg 比較；\* $p < 0.05$ , day Blank 與 day7 BAC 比較；\* $p < 0.05$ , day10 blank 與 day10 BAC 比較；\* $p < 0.05$ , day10 BAC 與 day10 10mg/kg 比較；\* $p < 0.05$ , day10 BAC 與 day10 100mg/kg 比較

#### d. 蘇木紫&伊紅染色(HE stain)

角膜上皮細胞由 5-6 層細胞所堆疊而成，但受到 BAC 傷害後，會影響到細胞的排列及厚度。在組織切片後，利用 HE 染色的結果中發現，傷害組的角膜上皮細胞受損嚴重且排列混亂(如圖四之一 BAC 組)，尤其是中央區域厚度明顯降低，同時輪部細胞也有減少的現象。而高劑量組相對之下可以觀察到修復的現象，趨近於正常組的表現，在定量結果方面，角膜總厚度、上皮厚度、基質在中央角膜中，經由餵食中草藥後有上升的趨勢(如圖四之二 A, B, C)，可知中草藥在細胞厚度上有修復之作用。



圖四之一、Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠角膜 HE 染色。

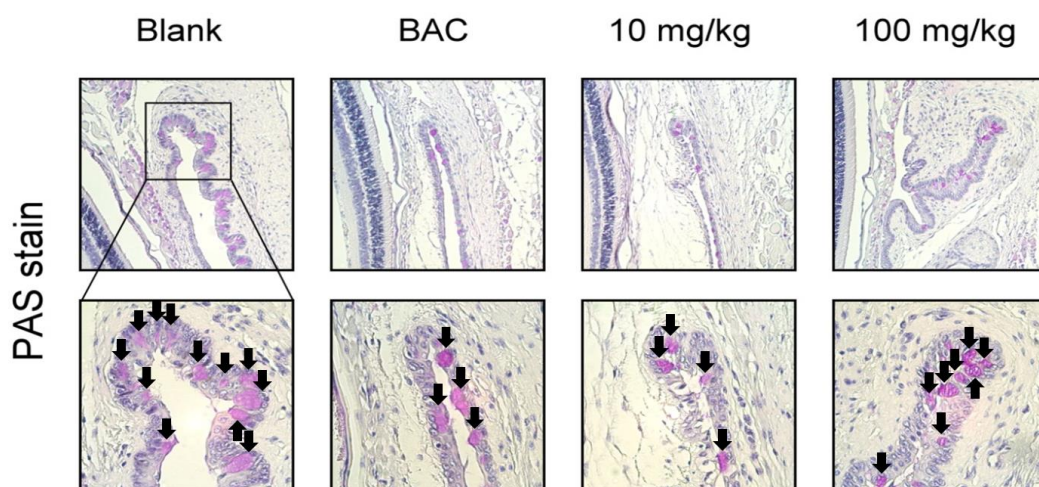


圖四之二、

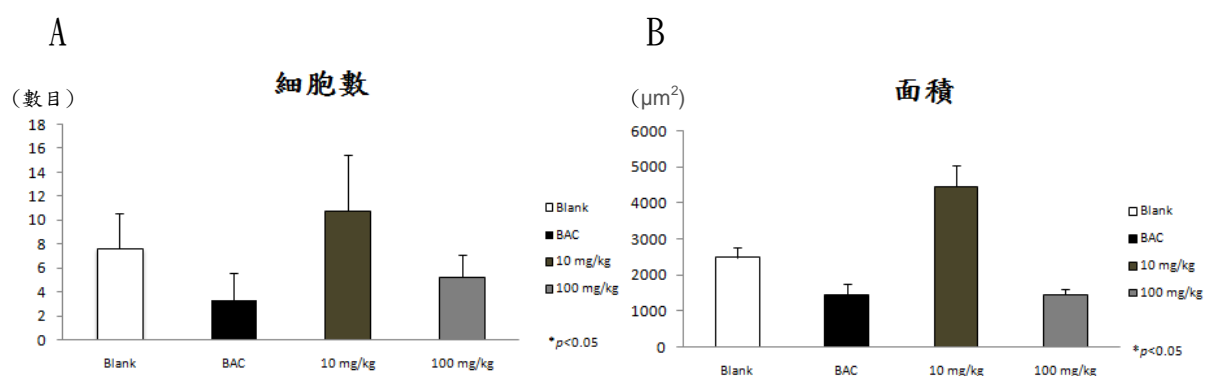
(A). Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠角膜總厚度 HE 染色定量結果。 $*p < 0.05$ ，CC BAC 與 CC 100mg/kg 比較； $*p < 0.05$ ，PC blank 與 PC BAC 比較  
 (B). Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠角膜上皮厚度 HE 染色定量結果。 $*p < 0.05$ ，CC blank 與 CC BAC 比較  
 (C). Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠角膜基質厚度 HE 染色定量結果。 $*p < 0.05$ ，CC BAC 與 CC 10mg/kg 比較； $**p < 0.001$ ，CC BAC 與 CC 100mg/kg 比較； $*p < 0.05$ ，PC blank 與 PC BAC 比較；L BAC 與 L 10mg/kg 比較  
 (CC:Central Cornea<中央角膜>; PC:Peripheral Cornea<周圍角膜>; L:Limbus<輪部>)

### e. 磷酸-希夫染色(PAS stain)

在淚液分層中，黏液層位於淚液的最底層，由上下結膜中的杯狀細胞所分泌，黏液層可與上皮細胞接觸，使之變成親水性，當杯狀細胞減少時，會使黏液層分泌不足，造成淚液無法均勻分布在眼球表面。透過PAS染色，分析穹窿結膜上的杯狀細胞表現，發現傷害組的杯狀細胞數明顯減少，面積也有大幅下降(如圖五之一)。在高劑量的部份，細胞數量及面積都有提升，雖然還未達到趨近正常組的表現，然而在低劑量的部分細胞數量及面積都有大幅提升，甚至遠高於正常組(如圖五之二 A, B)，可知道中草藥不但可以對杯狀細胞的受損情況達到減緩的效果，還可以促使杯狀細胞的生長。



圖五之一、Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠結膜中杯狀細胞 PAS 染色。  
(黑色箭頭:杯狀細胞<紅紫色>)

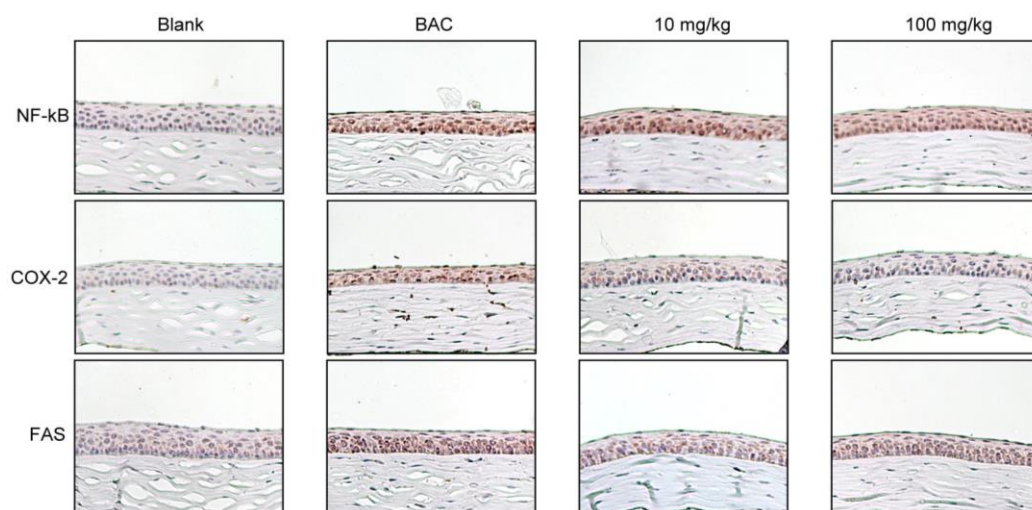


圖五之二、(A). Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠結膜中總杯狀細胞數量定量結果。  
(B). Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠結膜中總杯狀細胞面積定量結果。

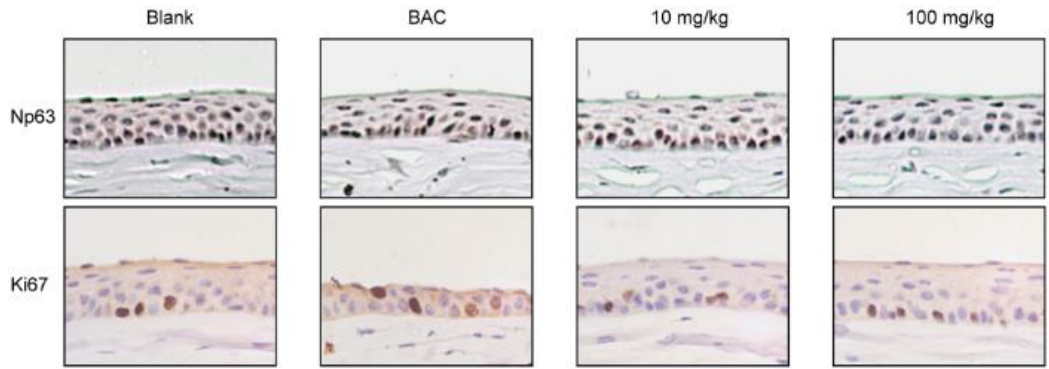


#### f. 免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry Stain)

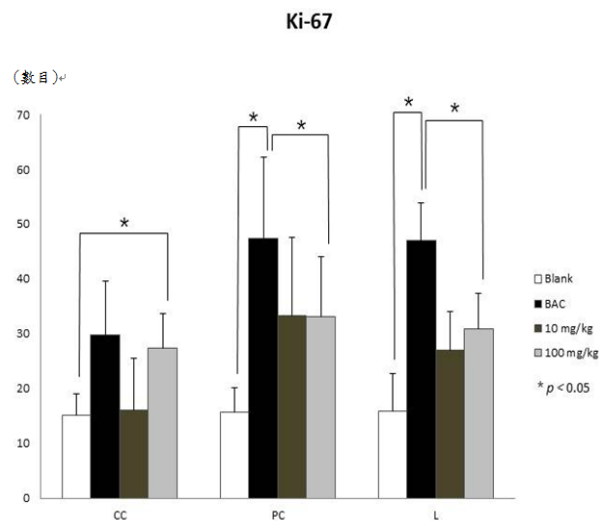
角膜上皮細胞是由許多細胞緊密堆疊而成，形成一層光滑的眼球表面，當受到傷害時可能產生一些發炎因子，或是影響到基底層細胞的分化及增生。根據 IHC 實驗結果發現，發炎因子 NF-kB、cox-2、Fas 的部分，傷害組明顯多於劑量組(如圖六之一)，且觀察到角膜上皮細胞層數均有變薄且細胞凌亂的情形，在經由餵食中草藥後發炎因子及細胞層數均有修復緩解的作用；細胞分化(p63)及增生(ki67)部分中，正常具有分化和增生能力的細胞位於角膜上皮細胞之基底層，而在傷害組中，因細胞修補速度趕上不受損速度，因此具分化能力細胞跑至上層細胞中，而在劑量組中，具分化能力的細胞維持在角膜上皮細胞基底層中(如圖六之二)；細胞增生的部分，經由定量得知，傷害組角膜上皮細胞中，無論是中央角膜、周邊角膜或是輪部，具有增生能力的細胞皆遠多於正常組及劑量組(如圖六之三)，可能由於角膜受到傷害後需進行修補，使得具有增生能力的細胞在傷害組中大量出現，而在劑量組中對於角膜受損有減緩的效果，因此具有增生能力的細胞數量下降。



圖六之一、Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠角膜上皮細胞 IHC(NF-Kb、COX2、FAS)染色結果。



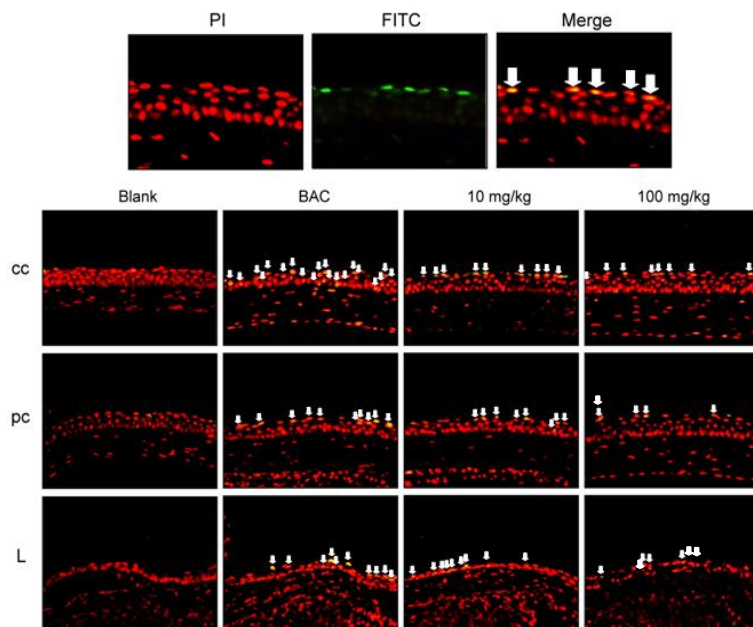
圖六之三、Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠角膜上皮細胞 IHC(Np63、Ki67)染色結果。



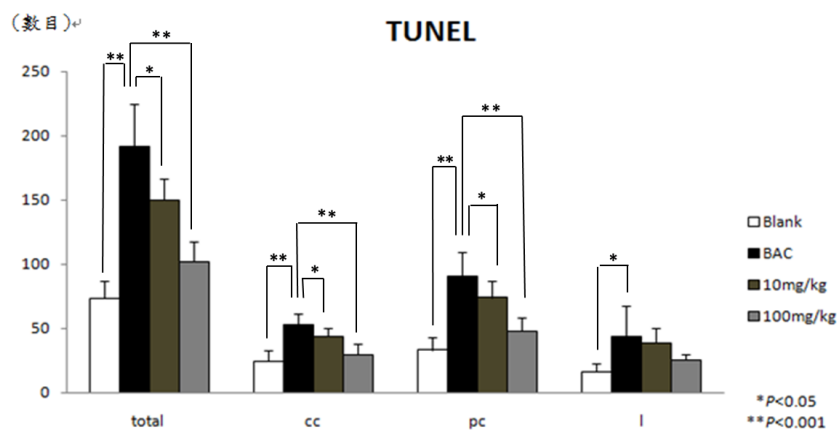
圖六之二、Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠角膜上皮細胞 IHC(Ki67)定量結果(CC:Central Cornea；PC:Cornea:L:Limbus)。\* $p < 0.05$ ，CC blank 與 CC 10mg/kg 比較；\* $p < 0.05$ ，PC blank 與 PC BAC 比較；\* $p < 0.05$ ，PC BAC 與 PC 10mg/kg 比較；\* $p < 0.05$ ，L blank 與 L BAC 比較；\* $p < 0.05$ ，L BAC 與 L 10mg/kg 比較 (CC:Central Cornea<中央角膜>；PC:Peripheral Cornea<周圍角膜>；L:Limbus<輪部>)

g. 末端脫氧核苷酸轉移酶脫氧尿苷三磷酸切口末端標記  
(TerminaldeoxynucleotidyltransferaseUTP Nick End Labeling, TUNEL)

當細胞受損時，使細胞走向凋亡路徑，本實驗經由包埋切片後，透過 TUNEL 觀察細胞凋亡的現象，在傷害組中，因受到 BAC 傷害後，不僅角膜上皮細胞有凋亡的情形(黃色螢光)，甚至在基質部分也有發現有細胞凋亡的現象(如圖七之一)，而在劑量組中，細胞凋亡情形有明顯減少且只發生於角膜上皮細胞的最頂層，在定量結果中也發現無論在中央角膜、側邊角膜凋亡細胞數目在餵食中草藥後遠小於傷害組(如圖七之二)，可知中草藥對於細胞凋亡有抑制效果。



圖七之一、Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠角膜上皮細胞 TUNEL 染色結果。(白色箭頭；有黃色螢光，代表凋亡的細胞)

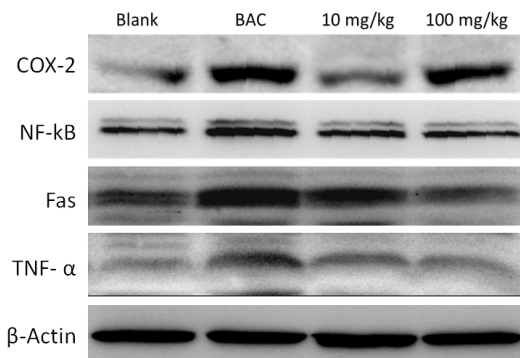


圖七之二、Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠角膜上皮細胞 TUNEL 染色定量結果。

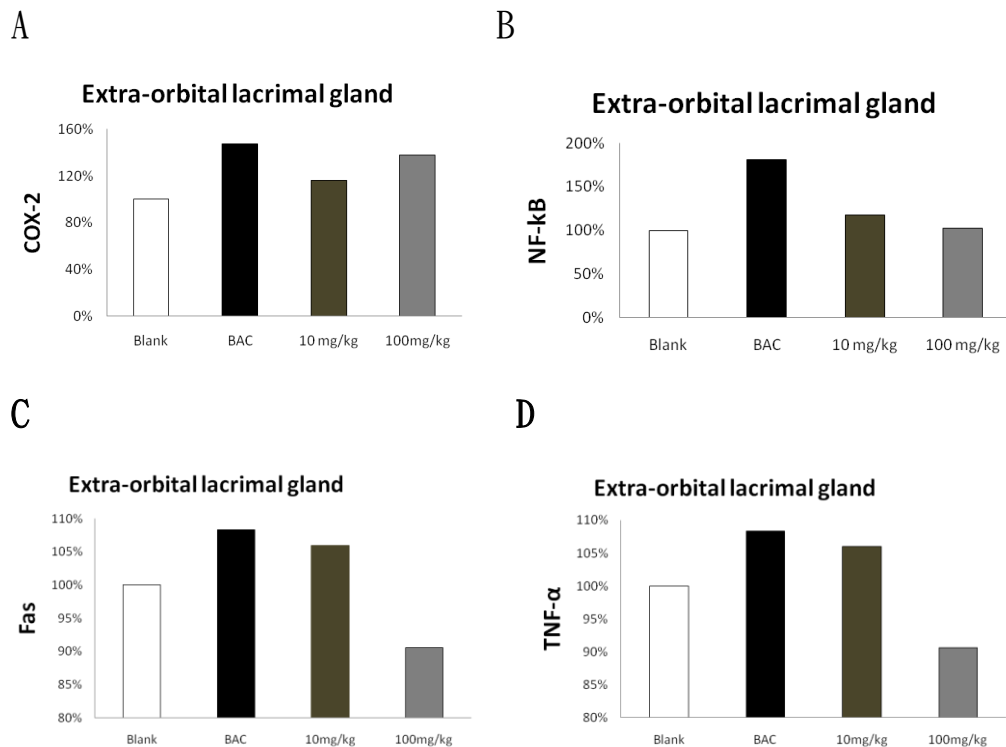
\*\*p<0.001, total blank 與 total BAC 比較; \*p<0.05, total BAC 與 total 10mg/kg 比較; \*\*p<0.001, total BAC 與 total 100mg/kg 比較; \*\*p<0.001, CC blank 與 CC BAC 比較; \*p<0.05, CC BAC 與 CC 10mg/kg 比較; \*\*p<0.001, CC BAC 與 CC 100mg/kg 比較; \*\*p<0.001, PC blank 與 PC BAC 比較; \*p<0.05, PC BAC 與 PC 10mg/kg 比較; \*\*p<0.001, PC BAC 與 PC 100mg/kg 比較; \*p<0.05, L BAC 與 L 10mg/kg 比較 (CC:Central Cornea<中央角膜>; PC:Peripheral Cornea<周圍角膜>; L:Limbus<輪部>)

### g. 西方墨點法(Western blot)

在眼睛受到 BAC 傷害後，便影響到淚液的品質及分泌量，而在小鼠淚液中水層主要依靠來自於外淚腺的分泌，因此本實驗也利用小鼠之外淚腺進行蛋白分析，觀察是否當角膜上皮細胞在發炎的同時，主要分泌淚液之腺體也同時產生發炎情形。經由 Western bolt 分析後，可發現在發炎因子的部分，無論是 COX-2，NF-kB，Fas，TNF- $\alpha$  的表現量明顯高於正常組及劑量組(如圖八之一)，在定量後得知，COX-2 發炎因子雖然在低劑量組及高劑量組皆低於傷害組，但低劑量組使 COX-2 發炎因子下降來的多(如圖八之二 A)，其餘發炎因子 NF-kB，Fas，TNF- $\alpha$  在經由餵食中草藥後，皆有明顯改善的效果，對照於上述角膜 IHC 染色有相符的結果，可說明中草藥對於抗發炎有顯著的現象。



圖八之一、Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠外淚腺 Western blot 結果 (抗體:COX-2, NF-kB, Fas, TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ -Actin)



圖八之二、(A). Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠外淚腺 Western blot(COX-2)定量結果。  
 (B). Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠外淚腺 Western blot(NF-kB)定量結果。  
 (C). Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠外淚腺 Western blot(Fas)定量結果。  
 (D). Blank、BAC、10mg/kg、100mg/kg 小鼠外淚腺 Western blot(TNF- $\alpha$ )定量結果。

## 討論.

根據先前文獻得知 BAC 對於眼睛造成發炎因子的上升、影響到淚液量和淚液品質及改變角膜上皮細胞型態的情形[11]，本實驗中利用中草藥來觀察其修復和改善狀況，經由結果發現在眼球表面的拍照，眼球表面的修復；淚液量測驗、淚液膜破裂實驗、PAS 染色中，可使淚液量增加、淚液品質與分泌改善以及杯狀細胞的修復；HE 染色中，細胞厚度的修復；IHC 染色中，發炎因子的下降，分化及增生細胞的改變；TUNEL 染色中，細胞凋亡的減少，皆與先前文獻使用測驗方法和結果相互符合。

然而在淚液量測驗中的第十天，無論是傷害組或是低劑量組淚液量都有回升的趨勢，可能與眼球表面過度乾燥時，而產生一種淚液負回饋的機制，使訊號不斷刺激淚腺分泌，或是與老鼠身體自我修復機制導致淚液在第十天中有回升的趨勢(如圖二之一 day10)。

在抗發炎效果方面，在文獻使用之與發炎相關因子 COX-2，NF-kB，Fas，TNF- $\alpha$ 的結果中[12]，除了 COX-2 在低劑量組中的量較高劑量組低(如圖八之二 A)，可能與小鼠個體差異及樣本數不足導致，而其餘發炎因子皆與本實驗結果相符，可得知中草藥對於 BAC 化學性傷害產生的乾眼症及發炎因子有明顯緩解修復功效。

後續可進一步對於 BAC 化學性傷害後，角膜血管新生與乾眼症的關係



及神經分布是否會產生變化，做更深入的研究，並且對其他淚腺進行分析，如麥氏管(Meibomian glands)：觀察淚液中脂質層的分泌；罕德氏腺(Haderian gland)：探討對於淚液分泌之關係。希望藉由本實驗，使得中草藥對於眼睛乾眼症方面有更詳細的了解，並能在視覺保健有極大的幫助。

## 六. 參考文獻：

1. Xiong C, Chen D, Liu J, et al. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:1850 - 1856.
2. Lee JS, Liu JJ, Hong JW, et al. Differential expression analysis by gene array of cell cycle modulators in human corneal epithelial cells stimulated with epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor (HGF), or keratinocyte growth factor (KGF). *Curr Eye Res.* 2001;23:69 - 76.
3. Baudouin C, Labbe A, Liang H, et al. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29:312 - 334.
4. Luo L, Li DQ, Doshi A, Farley W, Corrales RM, Pflugfelder SC. Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45: 4293 - 4301.
5. Fox RI, Chan R, Michelson JB, et al. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum.* 1984;27:459 - 461.
6. Wilson WS, Duncan AJ, Jay JL. Effect of benzalkonium chloride on the stability of the precorneal tear film in rabbit and man. *Br J Ophthalmol.* 1975;59:667 - 669.
7. Brito-Zerón P, Ramos-Casals M. Advances in the understanding and treatment of systemic complications in Sjögren's syndrome; EULAR-SS task force group. *Curr Opin Rheumatol.* 2014;26:520 - 7.
8. Sullivan DA, Krenzer KL, Sullivan BD, Tolls DB, Toda I, Dana MR. Does androgen insufficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous tear deficiency? *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40: 1261 - 1265.
9. Schrader S, Mircheff AK, Geerling G. Animal models of dry eye. *Dev Ophthalmol.* 2008;41:298 - 312.
10. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf* 2007; 5:75-92.
11. Diego JL, Bidikov L, Pedler MG, Kennedy JB, Quiroz-Mercado H, Gregory DG, Petrash JM, McCourt EA. Effect of human milk as a treatment for dry eye syndrome in a mouse model. Mol Vis. 2016;22:1095-1102.
12. Kwon JW, Choi JA, Shin EY, La TY, Jee DH, Chung YW, Cho YK. Effect of trapping vascular endothelial growth factor-A in a murine model of dry eye with inflammatory neovascularization. *Int J Ophthalmol.* 2016;9:1541-1548.