

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫 : 探討丹參活性分子對角膜水腫和角膜內皮細胞變性的 *
* 名稱 : 保護作用 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 陳品潔
學生計畫編號： MOST 106-2813-C-040-022-B
研究期間： 106年07月01日至107年02月28日止，計8個月
指導教授： 陳伯易

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： 中山醫學大學視光學系(所)

中華民國 107年02月08日

驗證口服丹參活性分子用於預防眼角膜內皮細胞老化和角膜水腫的生物保健效益

To Verify the Biological Health Benefits of Oral Danshen Active Molecules for the Prevention of Corneal Endothelial Cell Aging and Corneal Edema

學生：陳品潔(Pin-Jie Chen)

指導教授：陳伯易 (Bo-Yie Chen) 副教授

一、摘要

紫外線是造成眼角膜氧化損傷的主要風險因子，其衍生的氧化壓力驅動慢性的發炎反應，促成眼角膜水腫、不透明變性、上皮層再生不良、內皮細胞退化問題。是日常生活中加速眼角膜老化的主因，亦是台灣目前高齡視覺健康問題關注的焦點。而角膜內皮細胞密度減少後，不易再生，臨床上會增加復發性眼角膜水腫 (recurrent corneal edema) 損傷的風險，造成患者視覺品質下降。本實驗室先前的研究指出，紫外線 B (UVB) 會造成小鼠眼角膜內皮細胞損傷與減少，並與眼角膜之不透明變性與基質損傷有高度的相關性。此模式可作為有用的生物驗證平台。本研究以小鼠模式，探討並驗證口服水溶性丹參活性分子(DaSab)是否可用於緩解角膜內皮細胞老化、死亡和減輕角膜水腫的保健效益。本實驗使用 ICR 小鼠，做了為期 9 天的驗證，共分為四個組別：(1)空白對照組、(2)UVB 照射+佐劑(Vehicle)、(3) UVB 照射+丹參活性分子低劑量(UVB-DaSab low dose)、(4) UVB 照射+丹參活性分子高劑量(UVB-DaSab high dose)。採取角膜不透明度 (Corneal opacity) 和角膜損傷染色 (Lissamine Green Staining)評估策略，觀察丹參活性分子 (DaSab) 對於預防眼角膜內皮細胞老化和避免角膜水腫的保健效益。本研究結果預期可以為丹參活性分子用於護眼保健的功效提供參考。

關鍵字: 紫外線、丹參活性分子、角膜水腫、角膜內皮細胞、護眼保健

二、研究動機與研究問題

(1)現今高齡化社會，衍生出繁雜的高齡視覺健康問題。隨著年齡增長、老化，角膜內皮細胞不規則化變性，導致鈉鉀幫浦效率減弱，內皮細胞排水不良，基質細胞水腫引發角膜不透明變性。隨著人口老化，內皮細胞不規則化變性和角膜水腫的罹患率提升，但目前在眼科臨床上尚未有藥物用於改善角膜內皮細胞和基質層的老化變性，本研究探討丹參活性分子 B 於延緩角膜老化與病變預防之保健功效。

(2)本實驗以 UVB 誘導眼角膜損傷與角膜內皮細胞傷害模式作為驗證平台，藉由口服餵食水溶性丹參活性分子 (DaSab) 的方式，經由房水循環系統滋養角膜內皮細胞作用，達到緩解角膜內皮細胞老化的情況以及降低 UVB 所引起角膜水腫的生物證據。本研究作為開發視覺保健食品素材的基礎。

(3)丹參具有抗氧化、抗發炎、抗細胞凋亡以及脂質過氧化反應的功用，臨床上常應用於

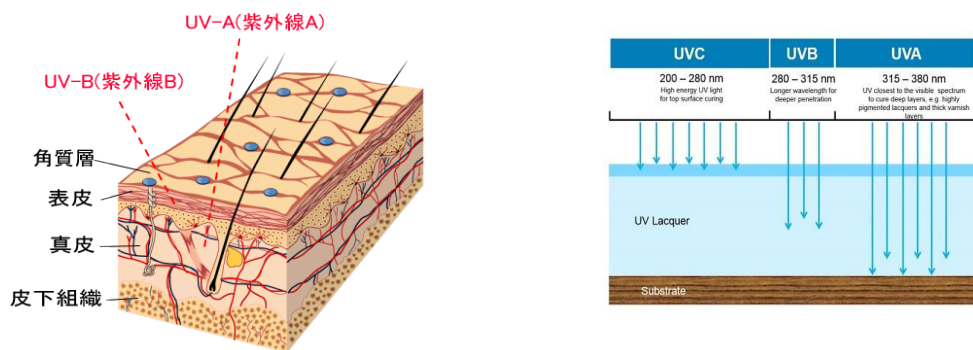
保護腦部缺血、預防動脈粥樣硬化。

文獻指出丹參化學成分中的丹參酚酸 B 鎂鹽 (DaSaB) 具有抑制鈉鉀幫浦及抗細胞凋亡的功能。因此藉由水溶性丹參活性分子 (DaSab) 抑制鈉鉀幫浦的活化機制，保護緊密連結(tight junction)的功能，探討水溶性丹參活性分子 (DaSaB) 抑制角膜水腫的效益。藉由丹參活性分子 (DaSaB) 的抗細胞凋亡的特性保護內皮細胞組織結構的完整性。

三、文獻回顧與探討

1. 紫外線

紫外線是不可見的光波其主要來源是太陽光，約在中午 12 點至 13 點間最強烈。依據「國際光照委員會」規範，依照紫外線的波長，可將紫外線分成紫外線 A (UVA)、紫外線 B (UVB) 和紫外線 C (UVC)。過度曝曬於紫外線下會提升罹患皮膚癌的風險。紫外線會造成皮膚癌的主要原因是因破壞皮膚細胞的 DNA。長期曝曬於 UVA 會產生皺紋；UVB 能量比 UVA 強烈，UVB 會直接破壞皮膚細胞的 DNA，是造成皮膚癌的主因；UVC 雖然能量極強，但是不會穿透大氣層。



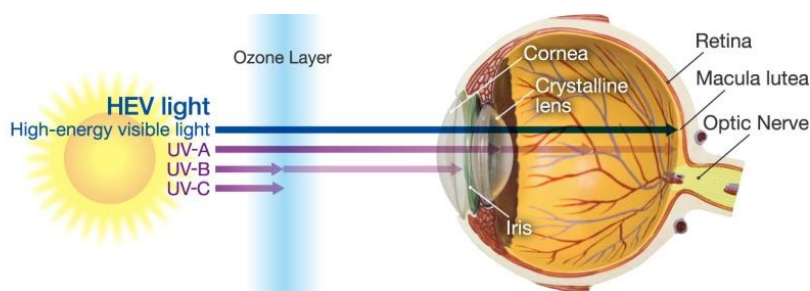
圖片來源: <https://www.uvcare1.com/>

圖片來源：

https://www.heraeus.com/en/hng/the_incredible_power_of_light/picture_curing_properties.aspx

2. UV 和眼睛之間的關聯性

UVA 是穿透力極強但破壞力不高的紫外線，長期暴露於 UVA 的環境之中會影響到黃斑部退化。而，UVB 主要是破壞眼前表的組織狀況，例如：白內障、角膜光損傷^(4,17)、翼狀贅肉和臉裂斑等傷害。另外，UVC 的能量雖然極強，但是絕大部分的 UVC 會被阻隔於大氣層外。



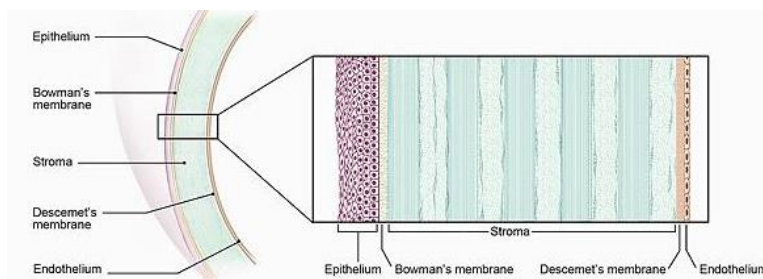
圖片來源：<http://uv420cut.com/why/>

當能夠到達地表的紫外線進入眼睛後主要由角膜和水晶體吸收調控。若暴露過量的紫外線將造成角膜與水晶體組織的氧化壓力與傷害。可能造成角膜潰瘍、角膜上皮細胞剝離或顆粒性白血球的浸潤等徵兆。這樣的傷害將隨著暴露時間而累積，在高齡長者中尤其常見相關退化性傷害，若為長時間戶外工作且未適當預防，將可能成為角膜退化性損失的高風險族群。

目前在小鼠實驗中有研究指出角膜在紫外線照射下會誘發蛋白質變性，顯著性提升 NF- κ B 與 DNA 的結合和 TNF- α 的生成。經由 UVB 的光照之後，小鼠角膜會產生混濁、基質層水腫、上皮細胞脫落、角膜細胞丟失和內皮細胞水腫⁽²⁰⁾。

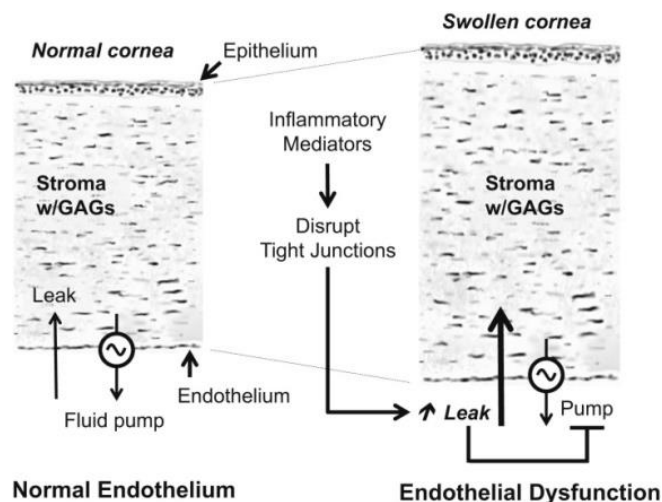
3. 角膜 (Cornea) 內皮細胞層老化

角膜是由蛋白質和細胞構成之透明且無血管分布之組織。角膜具備屈光功能，提供整體屈光系統約 2/3 的屈光力(約 40 屈光度)，且無血管分布，養分來源由淚液和房水供給。可將角膜分成 5 層: 上皮細胞層 (epithelium)、鮑曼氏層 (Bowman's membrane)、基質層 (stroma)、德斯密氏層 (Descemet's membrane)、內皮細胞層 (endothelium)。其中本計畫著重之內皮細胞層，在沒有缺氧或受損狀況下是呈現六角形且大小相同、規則排列的，當內皮細胞老化或長期缺氧後會變成不規則狀且厚度也會愈來愈薄。



圖片來源：<https://nei.nih.gov/health/cornealdisease>

內皮細胞和基質層之間的 Na^+ - K^+ 幫浦可以排除過多的水分⁽¹³⁾。當內皮細胞老化，幫浦效果減弱，內皮細胞排水功能不良，將提高角膜水腫風險⁽¹⁰⁾，且內皮細胞老化會引發重複性角膜水腫問題^(14,9)。



圖片來源：<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483511002715>

4.房水循環

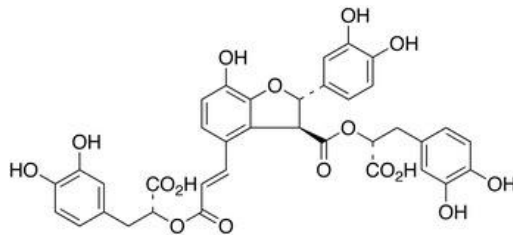
房水存在於前房與後房之間，房水的組成成分與血漿類似，與血漿不同的是房水還含有少許的蛋白質、葡萄糖、乳酸和維他命 C。房水的功用為提供氧氣和營養物至角膜、虹膜和水晶體⁽¹⁵⁾，同時幫助眼內代謝循環和支持眼球內部，維持眼球形狀⁽¹⁾。主要的房水循環是經由眼內壓⁽¹¹⁾驅動形成的。循環途徑從後房經由瞳孔，再流至前房靜脈竇進入體循環形成⁽¹²⁾。

5.水溶性丹參活性分子 (DaSab) 介紹

丹參(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)⁽¹⁶⁾，為唇形科多年生草本植物，為中國常用的藥用植物⁽⁶⁾。臨床上運用丹參的根部可以改善血液循環治療心血管的疾病⁽²⁾，且丹參具有抗發炎的效果可有效提供神經保護改善缺血性腦中風等症狀⁽⁶⁾。市面上常利用丹參製做成由舌下吸收的滴丸或口服用藥，滴丸提供的活性成分較多⁽⁹⁾。丹參的活性成分可分為脂溶性的醌、酮型結構和水溶性的酚酸類。主要包含隱丹參酮 (Cryptotanshinone)、丹酚酸 A(Salvianolic acid A)、丹酚酸 B(Salvianolic acid B)、丹參酮 I(Tanshinone I)、丹參酮 IIA(Tanshinone IIA)、丹參酮 IIB(Tanshinone IIB)。丹酚酸 B(Salvianolic acid B)是水溶性的丹參活分子(DaSab)⁽⁷⁾，由 3 分子的丹參素(Danshensu)和 1 分子的咖啡酸(Caffeic acid)縮合而成，具有抗氧化⁽³⁾、抗發炎等功效⁽⁸⁾。臨床用途常用於治療心血管疾病，例如冠狀動脈疾病、腦血管疾病及動脈粥樣硬化⁽¹⁾。



圖片來源：<http://www.itmonline.org/arts/salvia.htm>



圖片來源：<https://www.scbt.com/scbt/product/salvianolic-acid-b-121521-90-2>

二、研究方法與步驟

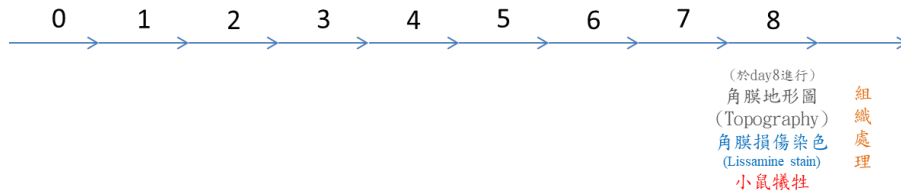
1.實驗材料：

- (1)ICR 母鼠
- (2)計時器
- (3)紫外燈箱
- (4)溫度計
- (5)麻醉藥
- (6)餵食針、針頭
- (7)丹參酚酸 B(Salvianolic acid B)藥粉
- (8)筆記型電腦、拍照用顯微鏡轉接頭
- (9)食鹽水

2、動物實驗組別：

本實驗進行 9 天，實驗採用八週齡的 ICR 母鼠，實驗過程均給予正常的飲水及飼料，將 ICR 小鼠分為四組。

實驗組別與流程規劃圖如下：



(1)空白對照組 (Blank)：在正常環境下，無紫外線照射。於 Day 8 進行角膜地形圖 (Corneal Topography)、角膜損傷染色 (Lissamine green staining) 拍照及犧牲。

(2)UVB 照射+佐劑 (Vehicle)：小鼠於 Day 1~Day 7 早上照射 90 秒的紫外線。於 Day 8 進行角膜地形圖 (Corneal Topography)、角膜損傷染色 (Lissamine green staining) 拍照及犧牲。

(3)UVB 照射+水溶性丹參活性分子低劑量組 (UVB-DaSab low dose)：小鼠於 Day 1~Day 7 早上照射 90 秒的紫外線，且小鼠在 Day 0~Day 7 早晚進行口服餵食水溶性丹參活性分子低劑量組 (UVB-DaSab low dose)，且需要間隔 8 小時。於 Day 8 進行角膜地形圖 (Corneal Topography)、角膜損傷染色 (Lissamine green staining)拍照及犧牲。

(4)UVB 照射+水溶性丹參活性分子高劑量組 (UVB-SaB high dose)：小鼠於 Day 1~Day 7 早上照射 90 秒的紫外線，且小鼠在 Day 0~Day 7 早晚進行口服餵食水溶性丹參活性分子高劑量組 (UVB-SaB high dose)，且需要間隔 8 小時。於 Day 8 進行角膜地形圖 (Corneal Topography)、角膜損傷染色 (Lissamine green staining) 拍照及犧牲。

3.角膜地形圖 (Corneal topography) 拍照與定量

使用自製角膜地圖儀拍照，將小鼠眼睛表面平分成八等分，中心環為定位環，定位環的後四環為定量環，一個等分若有一環損傷則得 1 分，每個等分最高有 4 分，全部的最高得分為 32 分。

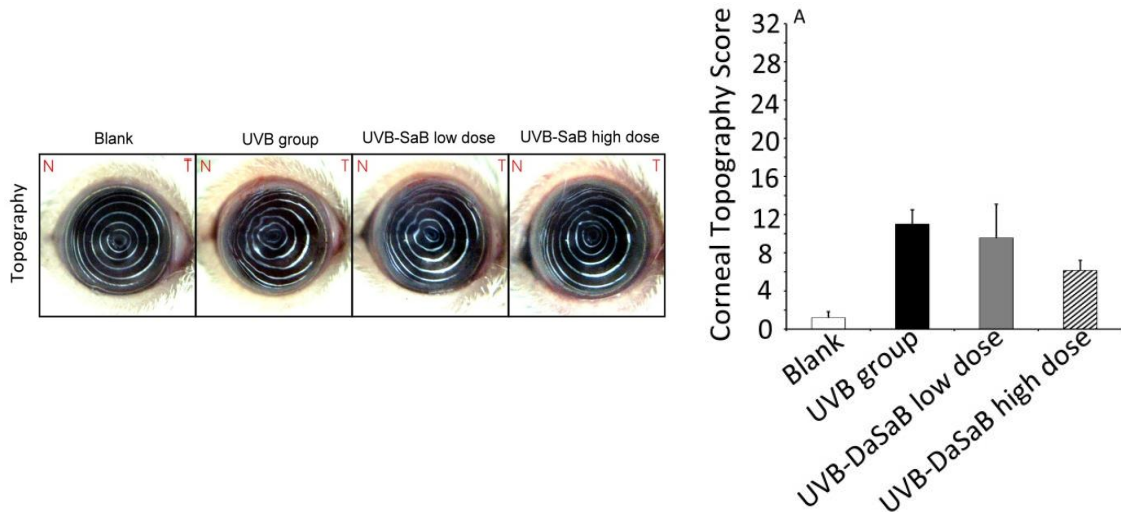
4.角膜損傷染色 (Lissamine green staining) 拍照與定量

利用 Lissamine green 染色分析受損的角膜上皮組織，當角膜上皮組織上附著藍色小點代表角膜有損傷，染色面積越大表示此處角膜受損面積越大。利用 Image J定量分析角膜損傷染色區域面積。

五、實驗結果與討論

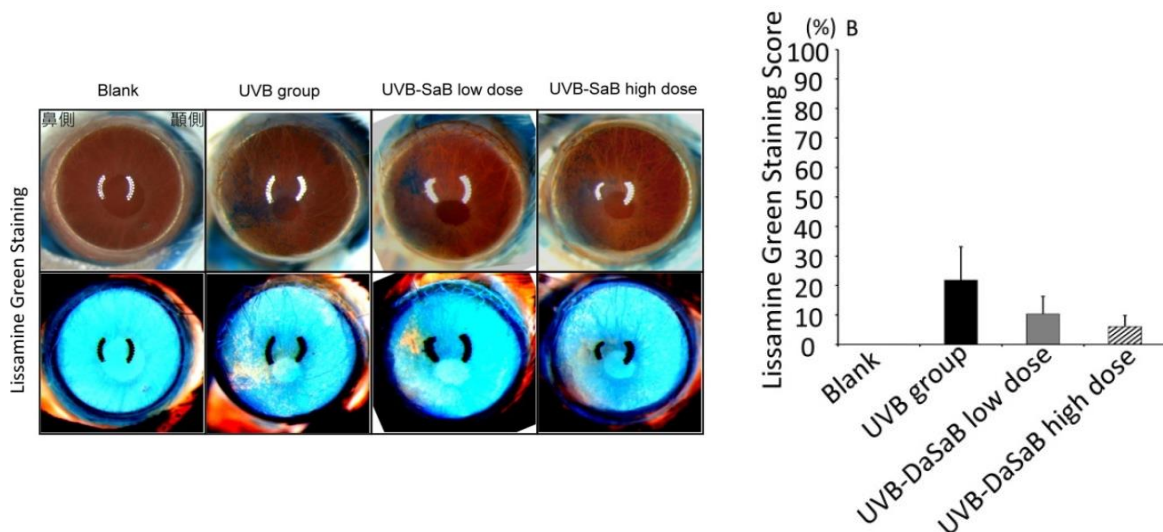
1. 角膜地形圖(Corneal Topography)

由角膜地形圖定性分析可以觀察出 UVB 照光組鼻側同心圓較空白對照組扭曲程度。在投予水溶性丹參活性分子後，發現角膜地形圖變得比較規則。而且高劑量組別的同心圓相較於低劑量組的更為規則。本研究發現當角膜受到紫外線的損傷前，投予水溶性丹參活性分子可以減低角膜地形圖扭曲變形的程度。未來可以利用此一特性作為臨床實驗的參考。



2. 角膜損傷染色(Lissamine green)

對於角膜損傷染色的定性分析，紫外線照光組在鼻側區域的損傷程度較投藥組多。且根據角膜損傷染色面積影像處理後進行了角膜損傷染色定量分析，發現 UVB 照光組的角膜損傷染色比空白對照組多。在進行投藥研究後，發現投藥組角膜損傷染色面積都較照光組少，且染色的面積也與投藥劑量有相關性。由實驗結果發現服用高劑量水溶性丹參活性分子的小鼠角膜光損傷面積明顯比照光組少。由於，水溶性丹參活性分子具有清理自由基的作用，可利用此一特性在臨床實驗中對於眼表損傷的保護。



六、結論

在紫外線光損傷誘導模式中，口服丹參活性分子減緩了紫外線對小鼠造成的傷害。因為小鼠於口服水溶性丹參活性分子 (DaSaB) 後，小鼠顯著維持了內皮細胞層的密度和有效減緩了發炎反應產生的浸潤細胞，可能是因為水溶性丹參活性分子 (DaSaB) 具有抗氧化和抗發炎的功用，所以 UVB 照光小鼠模式在有服用水溶性丹參活性分子 (DaSaB) 藥物的小鼠中具有預防紫外線引起的角膜外觀發炎損傷及角膜的內皮細胞退化與基質細胞水腫的效益。本研究在高劑量組的小老鼠研究中，角膜地形圖、角膜損傷染色，數據皆顯示出與紫外線照射組有著顯著性的差異。證實角膜保護效果與水溶性丹參活性分子 (DaSab) 攝取劑量相關。

根據實驗的結果，發現水溶性丹參活性分子可以應用於保護角膜外觀損傷、角膜的完整度和內皮細胞狀態。驗證水溶性丹參活性分子具有抗發炎、抗氧化等功能。未來可以將水溶性丹參活性分子應用於臨床實驗中，例如：延緩角膜老化等各方面的研究探討。也可以將水溶性丹參活性分子的抗氧化特性應用在白內障動物實驗的探討研究方面。

七、參考文獻

- 1.Feng Chen, Changyao Wang,Jintang Sun, Jin Wang,Lanfeng Wang, and Jianmin Li **Salvianolic acid B reduced the formation of epidural fibrosis in an experimental rat model.** Journal of Orthopaedic Surgery and Research 2016 11:141
- 2.Guang-Rong Zhaoa, Heng-Ming Zhanga, Ting-Xiang Yea, Zhi-Jun Xianga, Ying-Jin Yuana, Zhi-Xin Guob, Li-Bin Zhao. **Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B.** Food and Chemical Toxicology,46, 73–81
- 3.Tsai-Hui Lin and Ching-Liang Hsieh. **Pharmacological effects of Salvia miltiorrhiza (Danshen) on cerebral infarction.** Chinese medicine 2010 5, 22..
- 4.David Pei-Cheng Lin, Han-Hsin Chang, Li-Chien Yang, Tzu-Ping Huang, Hsiang-Jui Liu, Lin-Song Chang, Chien-Hsun Lin, and Bo-Yie Chen. **Assessment of ultraviolet B–blocking effects of weekly disposable contact lenses on corneal surface in a mouse model.** Mol Vis. 2013; 19: 1158–1168
- 5.Liviu-Daniel Galatchi. **UVB and UVA effects on both aquatic organisms enzymes and enzymatic reactions made by pure enzymes.** BMC Plant Biology2005 5(Suppl 1):S17
- 6.Yu Liu, Yuhong Huang, Caiyan Zhao, Xiude Qin, Qinghua Zhu, Sheng Chen, Jinglai Qu. **Salvia miltiorrhiza injection on pulmonary heart disease: a systematic review and meta-analysis.** The American journal of Chinese medicine 42, 1315-1331. Med. 42, 1315 (2014).
- 7.Wen-yu Wu¹ and Yi-ping Wang. **Pharmacological actions and therapeutic applications of Salvia miltiorrhiza deposite salt and its active components.** Acta Pharmacol Sin. 2012 September; 33(9): 1119– 1130.
- 8.Chun-Yan SU, Qlan-Liang Ming, Khalld RAHMAN,Ting Han, Lu-Ping Qin. **Salvia miltiorrhiza:**

- Traditional medicinal uses, chemistry, and pharmacology.** Chinese Journal of Natural Medicines Volume 13, Issue 3, March 2015, Pages 163-182
9. Mei-Ching Teng, Pei Chang Wu, Si-Ping Lin, Chien-Yun Wu, Ping-Hsun Wang, Chueh-Tan Chen, Bo-Yie Chen. **Danshensu protects against ultraviolet radiation-induced corneal inflammatory injury.** Exp Eye Res (under review).
 10. Leibowitz HM, Waring GO III. **Corneal Signs of Inflammation.** Clinical Diagnosis and Management, 1998:432-479.
 11. Makoto Aihara, James D Lindsey, Robert N Weinreb. **Twenty-four-hour pattern of mouse intraocular pressure,** Experimental Eye Research, 77, 681-686
 12. Cheryl R. Hann; W. Daniel Stamer; Michael P. Fautsch **Aqueous Humor Outflow: Dynamics and Disease.** Investigative Ophthalmology & Visual Science May 2015, .56, 2993-3003.
 13. Huang B¹, Blanco G, Mercer RW, Fleming T, Pepose JS. **Human corneal endothelial cell expression of Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase isoforms.** Arch Ophthalmol. 2003 Jun;121(6):840-5.
 14. Xian Li^{1,2}, Zhenhao Zhang^{1,3}, Lijun Ye¹, Jufeng Meng¹, Zhongyang Zhao¹, Zuguo Liu¹ & Jiaoyue Hu¹. **Acute ocular hypertension disrupts barrier integrity and pump function in rat corneal endothelial cells** Scientific Reports 31 July 2017
 15. Wenjia Wang, Xiuqing Qian, Hongfang Song, Mindi Zhang and Zhicheng Liu. **Fluid and structure coupling analysis of the interaction between aqueous humor and iris.** Biomed Eng Online. 2016 15(Suppl 2):133.
 16. Xiaobin Liu¹, Christy Xavier¹, Jamieson Jann¹ and Hongli Wu^{1,2}. **Salvianolic Acid B (Sal B) Protects Retinal Pigment Epithelial Cells from Oxidative Stress-Induced Cell Death by Activating Glutaredoxin 1 (Grx1)** Anthony Lemarié 3 November 2016
 17. Jennifer Hui-Chun Ho^{1, 2}, Yeu Su³, Ko-Hua Chen⁴, and Oscar Kuang-Sheng Lee^{5, 6}. **Protection of Thymosin Beta-4 on Corneal Endothelial Cells from UVB-Induced Apoptosis** Chinese Journal of Physiology 53(3): 190-195, 2010
 18. J. Cejkhov¹, S. Stípek², J. Crkovskh², T. Ardan¹ and A. Midelfart³. **Cellular and Molecular Biology Reactive oxygen species (ROS)-generating oxidases in the normal rabbit cornea and their involvement in the corneal damage evoked by UVB rays.** Histology and Histopathology
 19. Henry F. Edelhauser **The Balance between Corneal Transparency and Edema** The Proctor Lecture
 20. ie Yin,¹ Zhenping Huang,¹ Bo Wu,² Yao Shi,¹ Chunlin Cao,¹ Yuwen Lu¹ **Lornoxicam protects mouse cornea from UVB induced damage via inhibition of NF-κB activation** December 14, 2017