

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 ： 名 稱	眼瞼草本修復眼霜之生物功效評估：緩解紫外線發炎損傷
-----------------	---------------------------

執行計畫學生：施佳呈

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-086-B

研究期間：107年07月01日至108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 108年03月04日

眼瞼草本修復眼霜之生物功效評估：緩解紫外線發炎損傷

Bio-efficacy assessment of herbal eyelid cream in vivo for ameliorating UVB-driven inflammatory injury

學生：施佳呈 (Chia-Cheng, Shih)

指導教授：陳伯易 副教授 (Bo-Yie, Chen)

一、摘要：

傳統中草藥中，「丹參」原用於活血化癥，但相關研究指出其活性成分中「丹參酮 II A」具有抑制細胞發炎因子活化的特性。本研究利用紫外線 B 誘導小鼠眼瞼水腫發展。採取眼用霜處理方式，於小鼠動物模式下驗證丹參酮 II A 用於緩解眼瞼發炎水腫的藥理效益。實驗設計共分為 3 組，分別為：(A)組: UVB - Contact lens、(B)組：UVB - Vehicle 與(C)組: UVB - Vehicle + 丹參酮 II A (DAC)。傷害前 24 小時收集外觀起始數據，第 0 天以紫外線 B 照射誘導眼瞼水腫，並開始塗抹藥物(一日 4 次)。預計在每 12 小時收集外觀數據至傷後 48 小時，收取末端數據並犧牲小鼠，對小鼠眼瞼組織做組織切片與蘇木紫-伊紅染色，以評估丹參酮 II A 於緩解眼瞼水腫之藥理效益。本研究藉由眼瞼外觀數據初步評估丹參酮 II A 對於眼瞼水腫的緩解效果，並使用組織切片病理分析方式，評估其對於組織維持的效能。實驗結果顯示丹參酮 II A 在外觀變化與組織結構對於減少眼瞼水腫的作用有限。然而 UVB - Contact lens 組與 UVB - Vehicle 組具有顯著的眼瞼腫脹程度差異，表明此分析平台的可行性和可靠性。本研究結果整合醫學基礎實驗與醫學美容眼整形臨床需求，於未來可將丹參酮 II A 導入臨床眼用藥物開發研究，並媒合至醫療臨床現況，建構出一個醫學基礎學術研究與臨床眼整形術後回復產品開發的新契機。

關鍵字：眼瞼水腫、丹參酮 II A、護眼保健、草本眼霜

二、研究動機與研究問題：

2-1.研究動機：

- 眼整形手術術後眼瞼水腫回復問題

醫學美容手術技術日益進步，選擇整形美容風氣也日益興盛。透過國際美容整形外科學會 (International Society of Aesthetic Plastic Surgery, ISAPS) 的統計資料，接受美容手術人數逐年增加，在 2016 年接受美容手術相較於 2015 年更增加 45%，其中眼瞼相關美容手術在 2016 年佔全球美容手術中 12.9%，排名第 3，僅次於隆乳、抽脂。然而在眼瞼美容手術術後透過冰敷降低眼瞼水腫之方式，其實際效果有限。因此如何降低眼瞼術後腫脹程度，儼然成為現今醫療需共同解決的問題。

- 紫外線曝曬誘發眼瞼紅腫問題

「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)。紫外線 A (UVA)可穿透至真皮層並影響皮膚內結締組織，誘導皮膚細胞老化與色素沉澱，而紫外線 B (UVB)因能量較高，可造成皮膚內活性氧化物 (ROS) 的表現增加，更有機會誘發皮膚癌。眼瞼皮膚僅 0.33 mm，相較其他部位皮膚平均厚度為 3 mm，為人體皮膚最薄之處，尚且眼瞼內部有特化之胞器，其功能與維持眼表淚液穩定性有相關性。推論眼瞼受到紫外線曝曬傷害之風險相對其他部位更高，避免紫外線造成眼瞼腫脹為目前迫切的研究議題。

2-2.本研究預期可釐清的問題：

- (1) 建構紫外線誘發小鼠眼瞼發炎水腫之生物驗證平台。
- (2) 探討天然草本護眼眼霜於眼瞼曬後紅腫發炎之緩解效益。

2.3 本研究結果可提供的參考價值：

- (1) 眼瞼曬後發炎水腫使用丹參酮 II A 活性成分眼霜處理後腫脹程度緩解與組織保護之效果。
- (2) 醫學眼瞼美容手術，如：眼袋修護手術術後緩解發炎水腫之參考。

三、 文獻回顧與探討：

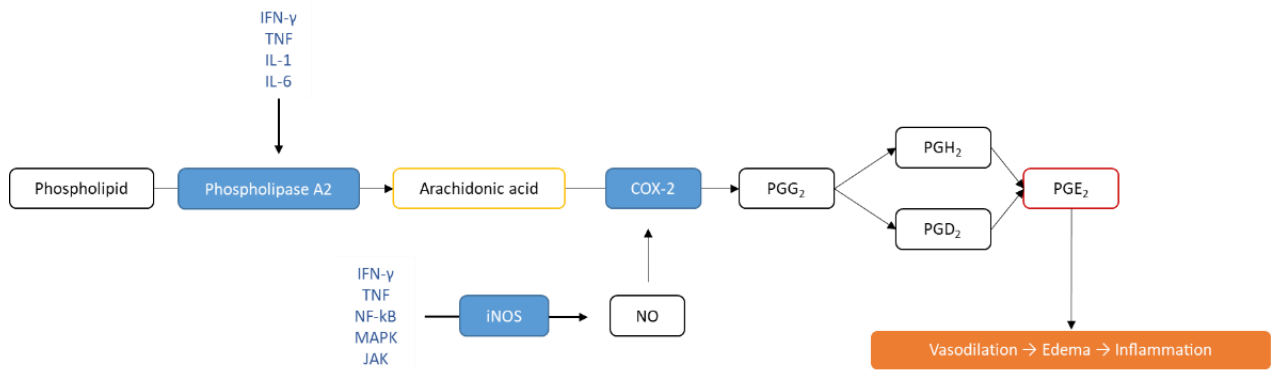
- 眼整形手術併發水腫症狀

眼整形手術範圍大多涉及上下眼瞼、眼眶周邊，此區域含有豐富的血管以及神經。因此常見術後併發症有眼瞼水腫、瘀血等，嚴重的術後不適更可能會有影響視力的風險產生。在眼整形術後，均會要求冰敷以避免眼瞼腫脹。但已有相關人體試驗指出，於 38 例有眼周圍皮膚鬆弛（眼袋）的測試者，在接受眼瞼美容手術後，一眼冰敷；另一眼不冰敷為對照組。實驗結果統計發現，在術後冰敷一天，測試者僅降低術後疼痛不適感，對於眼瞼水腫程度表現並無法有效改善[1]。在現今眾多接受眼瞼相關美容手術的需求者中，如何有效降低術後眼瞼水腫問題是一個極具發展性的研究方向。

- 發炎因子與水腫相關性

常見發炎以及過敏反應所誘發水腫的路徑為花生四烯酸 (arachadonic acid) 的脂肪酸代謝發炎途徑。當過敏原進入體內亦或是跌打損傷造成細胞破裂，均會產生發炎因子並介導發炎反應，進一步產生水腫之現象。在花生四烯酸 (arachadonic acid) 的產生途徑中，初步為發炎因子 IFN- γ , TNF, IL-1, IL-6 等會活化磷脂酶 A2 (Phospholipase A2) 促使細

胞磷脂質轉變為花生四烯酸 (arachadonic acid)，再透過環氧化酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 的作用下，合成出前列腺素 (Prostaglandins)。其中前列腺素 E2 (PGE₂)，可於發炎處誘使血管擴張，進而有水腫現象之產生[2]。而發炎因子 NF-κB, MAPK, JAK 等表現，活化一氧化氮合成酶 (Nitric Oxide Synthase, NOS)，於人體合成一氧化氮 (NO)，其可使環氧化酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 加劇轉變花生四烯酸 (arachadonic acid) 之效能 [3]，提高發炎反應及水腫程度。



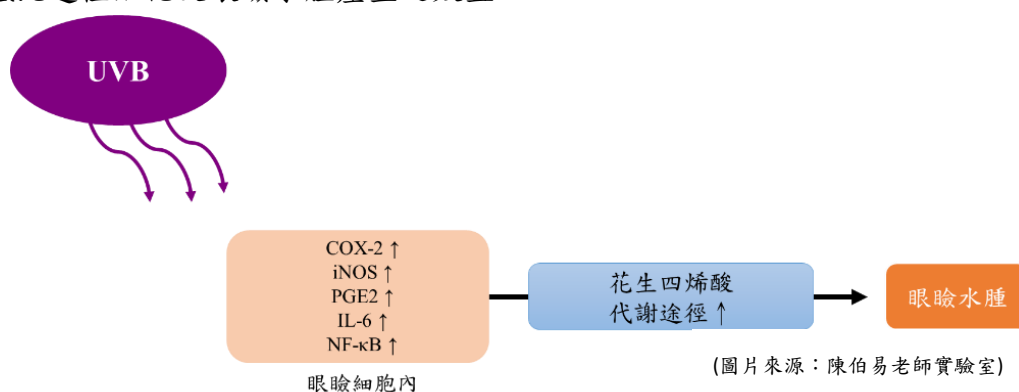
(圖片來源：陳伯易老師實驗室)

- 紫外線 B 誘導花生四烯酸路徑生成水腫模式推論

急性大量或是慢性長期照射紫外線 B (UVB)，可引起皮膚細胞的凋亡，進而有罹患皮膚癌的風險。在紫外線 B (UVB) 後，會產生水腫的發炎反應，並且在真皮層可發現嗜中性白血球 (Polymorphonuclear neutrophil, PMN) 的浸潤，以及 COX-2 基因表達提高伴隨前列腺素的產生與釋放[4]。

在細胞培養實驗模式下，紫外線 B (UVB) 可於小鼠的角質形成細胞 (mouse keratinocytes) 中提高細胞內前列腺素產生和前列腺素合成酶的表達[5]；另一研究提出在紫外線照射後角質形成細胞會有氧化物 4-HNE (4-Hydroxynonenal) 的生成，其發炎因子 IL-6、COX-2 和 iNOS 基因的表達增加[6]。紫外線 B 可於皮膚淋巴系統中，藉由下調內皮血管生成因 C (VEGF-C) 的表現，進而誘使血管擴張，造成水腫的發炎反應 [7] [8]。於急性紫外線 B 照射 SKH-1 裸鼠的動物實驗中，在照射後發現藉由 MAPK 的路徑提高發炎因子 NF-κB 的表達，尚且還增加 COX-2 和 iNOS 的活化[9]。

本研究推論紫外線 B (UVB) 照射模式，誘導小鼠眼瞼皮膚內發炎因子的活化，藉由花生四烯酸 (arachadonic acid) 代謝途徑，產生眼瞼水腫的方式，並探討丹參酮 II A 於傷害後降低此途徑活化及眼瞼水腫產生之效益。



(圖片來源：陳伯易老師實驗室)

- 丹參酮IIA 活性成分效益探討

丹參為唇形科 (Labiatae) 的植物，常使用其丹參乾燥根及根莖作為藥用。具有活血化癥、養血安神、清心除煩之功效，或用於月經不調、心絞痛、消炎止痛等，臨床上廣泛應用於治療心血管疾病[10]。透過現代藥理分析技術，已剖析出許多活性成分[11]，可將其分為水溶性的酚酸類以及脂溶性的二萜類。二萜類活性成分具有抑制發炎因子 NF- κ B 的抗發炎能力[12]，其中又以丹參酮IIA 具有極高的抗發炎作用，尚且對於心臟具有保護效益[13]，但其因為脂溶性，因此大多製成丹參酮 IIA 磺酸鈉 (sodium tanshinone IIA sulfonate)，以提高生物利用度，其活性成分效益探討如下：

- 抑制發炎因子表現

以脂多醣 (Lipopolysaccharide, LPS) 誘導小鼠巨噬細胞 (RAW 264.7 cell) 發炎的細胞培養研究中，在以丹參酮IIA 培養後，實驗結果發現能有效抑制脂多醣引起 RAW 264.7 巨噬細胞發炎反應中 COX-2 和 iNOS 的表達以及 NO 的生成[14][15]，尚且能抑制細胞發炎因子 IL-1 β , IL-6 與 TNF- α 的表現[16]；並且丹參酮IIA 還可抑制由 NF- κ B 誘導激酶 (NF κ B-inducing kinase, NIK) 及絲裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 所活化細胞發炎因子 NF- κ B 介導的發炎反應[17]。丹參酮IIA 於成骨細胞 (Osteoblast) 發炎症狀，可緩解細胞內環氧合酶-2 (COX-2) 表達並抑制前列腺素 E2 (PGE2) 的合成[18]。

- 心血管保護

探討在人類心肌細胞和血管內皮細胞缺血的狀態下自由基的生成量，闡明丹參酮IIA 能降低血管內皮自由基的增加[19]；另一個在心肌細胞缺氧缺糖的研究中，發現丹參酮IIA 可抑制發炎因子 NF- κ B 與 TNF- α 的活化避免心肌細胞凋亡[20]。

- 抗癌

丹參酮IIA 於肝癌細胞可抑制其生長並使其產生細胞凋亡[21]。在乳腺癌的研究發現丹參酮IIA 可造成癌細胞透過 caspase-3 蛋白表達顯著增加而產生抗癌作用[22]。將肺癌細胞移植至小鼠腿部產生腫瘤實驗，透過腹腔注射丹參酮IIA，可抑制腫瘤的擴大[23]。

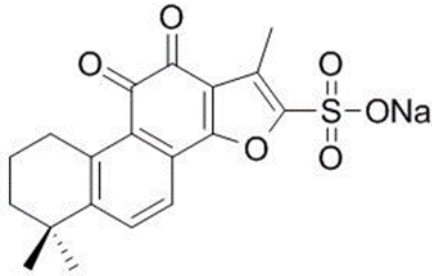
- 其他作用

- 肺動脈高壓症治療潛力

肺部靜動血壓過高時造成右心室需以更大的壓力才能將血液送出，嚴重會使右心室肥大與衰竭。在臨床試驗中發現丹參酮IIA 搭配肺動脈高壓藥物，可提高改善病狀的效果[24]。

- 肝炎

以刀豆蛋白(Concanavalin A, ConA)誘導小鼠肝炎的動物實驗，丹參酮II A 減少肝中的白血球浸潤與肝細胞凋亡，並且降低細胞發炎因子 TNF- α 和 IFN- γ 的活化[25]。



實驗使用藥物

Name: Tanshinone IIA-sulfonic sodium

Molecular Weight : 396.39

Formula : C₁₉H₁₇O₆S.Na

Type of Compound : Diterpenoids

Purity : \geq 98%

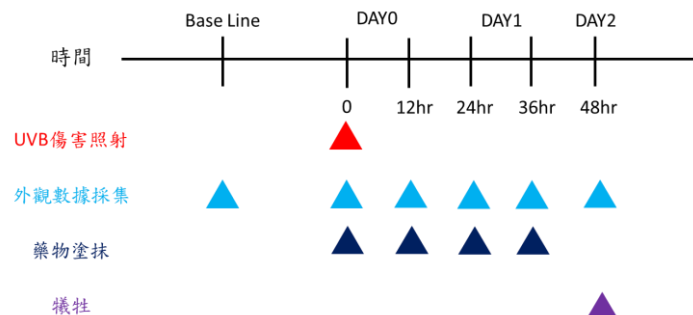
圖片、藥物來源：Chemfaces, Hubei

四、 研究方法與步驟：

4-1. 實驗器材：

- (1) 紫外線 B 燈管 (強度：8mW/cm²; 波峰：312nm, Viber Lourmat, Geemany)
- (2) Avertin 麻醉藥 (2.5%(w/v) working solution)
- (3) 凡士林 (Vehicle)
- (4) 丹參酮II A (Chemfaces, Hubei)
- (5) 解剖顯微鏡 (Nikon SMZ800, Japan)
- (6) 影像擷取系統 (Minisee software)
- (7) 拍攝相機 (Nikon J3, Japan)
- (8) 自製拍攝箱 (陳伯易老師實驗室)。
- (9) 計時器

4-2. 實驗流程：



執行步驟：

1. 在第0天建立紫外線誘發眼瞼水腫小鼠模式。
2. 外觀變化數據採集於傷害前、後及傷害後12, 24, 36, 48小時。
3. 模式建立後，藥物一天塗抹4次至傷後48小時。

4. 於傷後 48 小時犧牲小鼠，取出眼瞼組織進行後續組織包埋與切片染色分析。

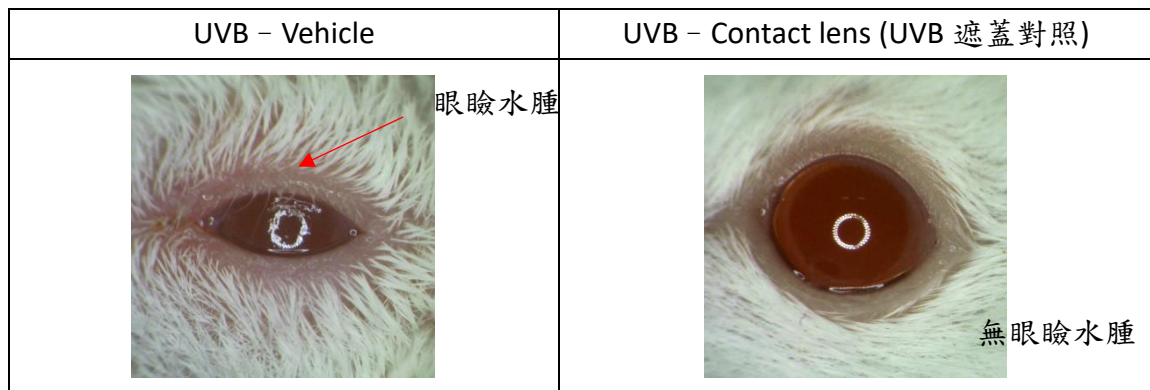
4-3.動物組別：

將小鼠隨機分為 3 個組別，分為：

- (1) UVB - Contact lens (n=8) (UVB 遮蓋組)(在建立與他組相同的照射條件下，配戴抗紫外線 B 隱形眼鏡避免眼瞼組織受到照射，以利與他組鑑別眼瞼水腫程度變化。)
- (2) UVB - Vehicle (n=8)
- (3) UVB - Vehicle + 丹參酮 II A (DAC) (n=8)

4-4.外觀腫脹程度評估之範例：

將小鼠固定於照攝平台上，使用實驗室影像拍攝系統，於各採樣時間點，採集小鼠眼瞼外觀數據。




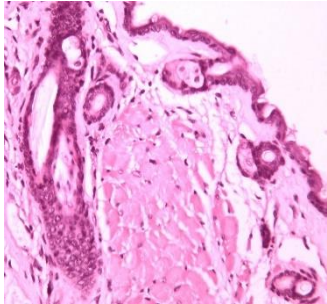
(圖片來源：陳伯易老師實驗室資料庫)

4-5.外觀腫脹分級分析：

將其眼瞼外觀腫脹程度分成 4 級，藉此方式將外觀數據量化以評估丹參酮 II A 於緩解眼瞼腫脹程度之藥理效益，分級分別為：第 0 級眼瞼幾乎無腫脹變化、第 1 級為眼瞼輕度腫脹、第 2 級為眼瞼中度腫脹、第 3 級為眼瞼重度腫脹。

4-6.組織病理學評估之範例：

小鼠犧牲後進行眼瞼組織切片染色病理分析，使用蘇木紫-伊紅染色方式，觀察眼瞼表、真皮厚度變化、噬中性白血球細胞(PMN)浸潤程度與眼瞼內肌肉排列變化及鱗狀上皮發生等，以評估小鼠眼瞼經歷誘發水腫發炎反應並使用丹參酮 II A 眼霜處理後，其對組織保護與維持的藥理效益。

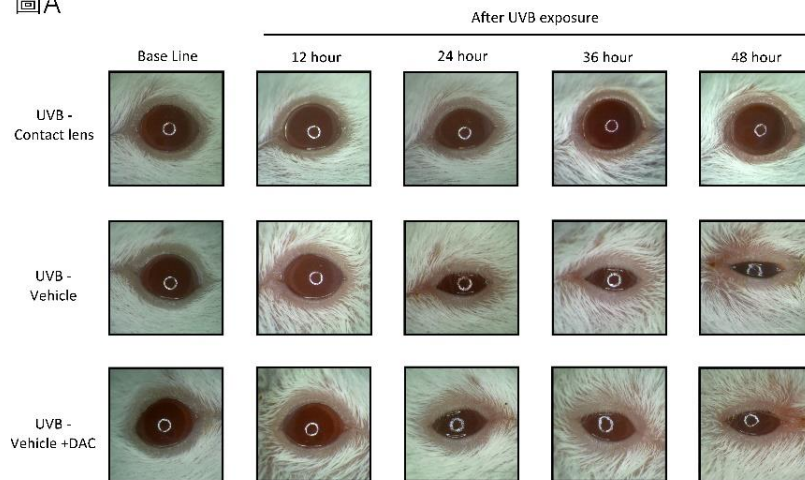
倍率	UVB - Vehicle	UVB - Contact lens (UVB 遮蓋對照)
200X	 <p>1. PMN 細胞浸潤(紅圈) 2.表、真皮厚度增加(紅箭頭) 3.眼瞼肌肉排列稀疏(黑箭頭)</p>	 <p>無任何病理變化 之眼瞼組織</p>

(圖片來源：陳伯易老師實驗室資料庫)

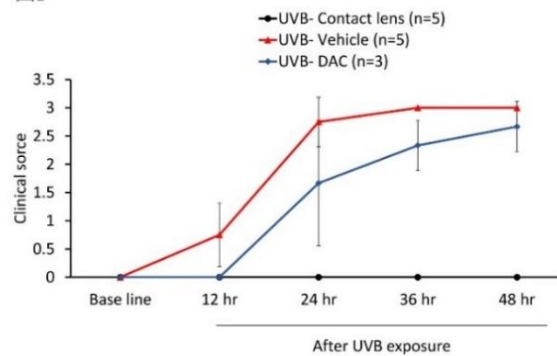
五、 本研究結果與討論

- (1) 外觀數據(圖 A)顯示使用丹參酮 II A 眼霜組 (UVB - Vehicle+ DAC) 並未能有效降低眼瞼腫脹程度，但是於 UVB - Contact lens 組與 UVB - Vehicle 組經外觀腫脹分級分析後，具有水腫程度上之差異(圖 B)，表明此生物驗證平的可行性及未來潛力發展性。

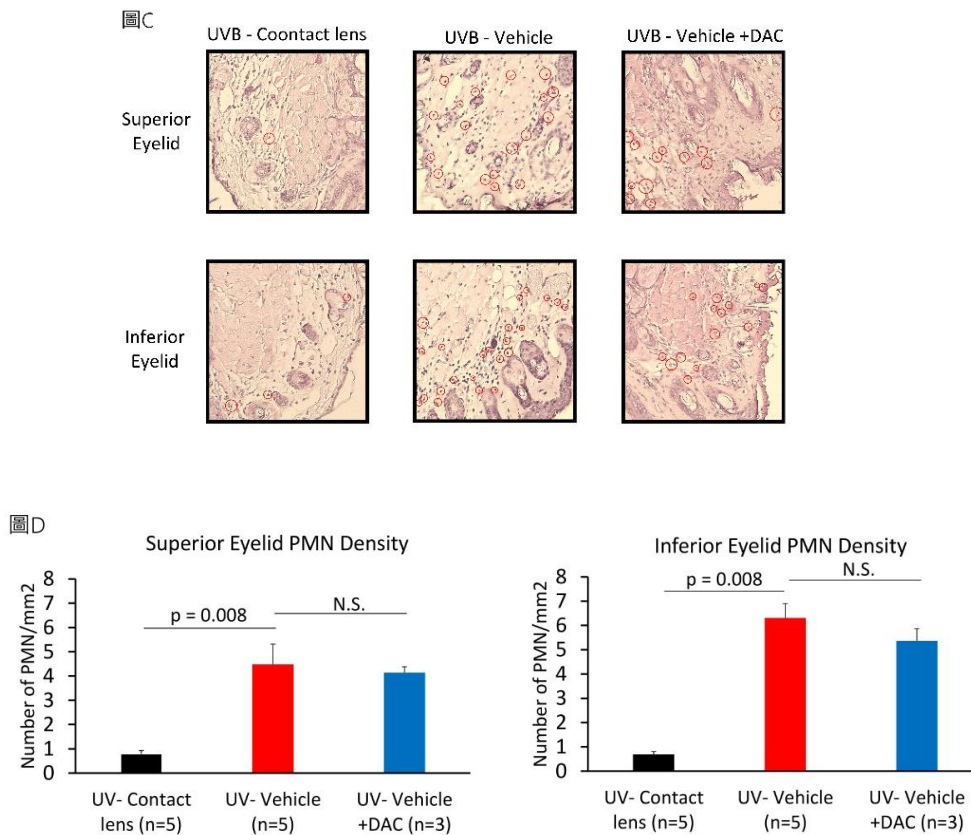
圖A



圖B



(2) 於組織病理分析中，UVB - Vehicle + 丹參酮 II A 組 (UVB - Vehicle+ DAC) 無法降低嗜中性白血球 (Polymorphonuclear neutrophil, PMN) 的浸潤程度(圖 C)，然而 UVB - Contact lens 組與 UVB - Vehicle 組之間的 PMN 浸潤程度具有統計學上的顯著差異(圖 D)，其結果與外觀數據具有相同變化的趨勢，提高此研究計畫使用之模式的可信度。



(3) 本研究計畫整合外觀數據變化與眼瞼組織微結構分析，均未能提出有效生物證據顯示丹參酮 II A 眼霜具有有效降低眼瞼水腫程度之效益。然而丹參酮 II A 應用於皮膚美白或是血管擴張之效果，能待相關實驗研究驗證。

六、 結論

藉由外觀腫脹程度指標及眼瞼微結構分析，均無法佐證使用丹參酮 II A 眼霜用於緩解眼瞼水腫之功效。然而本計畫中 UVB - Contact lens 組與 UVB - Vehicle 組於外觀變化及組織結構病理分析，皆具有程度上的差異，顯示本計畫緩解眼瞼或眼袋水腫驗證平台之可行性與可信度。於未來可篩選具發展性潛力素材，並將其導向臨床眼藥藥物開發，尚可鏈結醫美產業，提出新的眼瞼醫美護理方針。

七、 參考文獻：

1. Pool, S.M., et al., *The effect of eyelid cooling on pain, edema, erythema, and hematoma after upper blepharoplasty: a randomized, controlled, observer-blinded evaluation study*. *Plast Reconstr Surg*, 2015. 135(2): p. 277e-81e.
2. Zanoni, I., et al., *CD14 and NFAT mediate lipopolysaccharide-induced skin edema formation in mice*, in *J Clin Invest*. 2012. p. 1747-57.
3. Shin, J.I., et al., *Possible link between NO concentrations and COX-2 expression in systems treated with soy-isoflavones*. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. 1095: p. 564-73.
4. Wilgus, T.A., et al., *Topical application of a selective cyclooxygenase inhibitor suppresses UVB mediated cutaneous inflammation*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2000. 62(4): p. 367-84.
5. Black, A.T., et al., *UVB light upregulates prostaglandin synthases and prostaglandin receptors in mouse keratinocytes*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008. 232(1): p. 14-24.
6. Kostyuk, V., et al., *Photo-oxidation products of skin surface squalene mediate metabolic and inflammatory responses to solar UV in human keratinocytes*. *PLoS One*, 2012. 7(8): p. e44472.
7. Kajiya, K., et al., *Activation of the VEGFR-3 pathway by VEGF-C attenuates UVB-induced edema formation and skin inflammation by promoting lymphangiogenesis*. *J Invest Dermatol*, 2009. 129(5): p. 1292-8.
8. Sawane, M., et al., *Apelin attenuates UVB-induced edema and inflammation by promoting vessel function*. *Am J Pathol*, 2011. 179(6): p. 2691-7.
9. Abbas, S., et al., *UVB exposure enhanced benzanthrone-induced inflammatory responses in SKH-1 mouse skin by activating the expression of COX-2 and iNOS through MAP kinases/NF-kappaB/AP-1 signalling pathways*. *Food Chem Toxicol*, 2016. 96: p. 183-90.
10. Cheng, T.O., *Danshen: what every cardiologist should know about this Chinese herbal drug*, in *Int J Cardiol*. 2006: Netherlands. p. 411-2.
11. Li, M.H., et al., *Investigation of Danshen and related medicinal plants in China*. *J Ethnopharmacol*, 2008. 120(3): p. 419-26.
12. de las Heras, B. and S. Hortelano, *Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids*. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009. 8(1): p. 28-39.
13. Shang, Q., H. Xu, and L. Huang, *Tanshinone IIA: A Promising Natural Cardioprotective Agent*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012. 2012: p. 716459.
14. Chen, T.H., et al., *Tanshinone IIA from Salvia miltiorrhiza induces heme oxygenase-1 expression and inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide expression in RAW 264.7 cells*. *Mitochondrion*, 2007. 7(1-2): p. 101-5.
15. Liu, X.H., et al., *Induction of Heme Oxygenase-1 by Sodium 9-Hydroxyltanshinone IIA*

- Sulfonate Derivative Contributes to Inhibit LPS-Mediated Inflammatory Response in Macrophages*. Cell Physiol Biochem, 2015. 36(4): p. 1316-30.
16. Fan, G.W., et al., *The anti-inflammatory activities of Tanshinone IIA, an active component of TCM, are mediated by estrogen receptor activation and inhibition of iNOS*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009. 113(3-5): p. 275-80.
 17. Jang, S.I., et al., *Tanshinone IIA inhibits LPS-induced NF-kappaB activation in RAW 264.7 cells: possible involvement of the NIK-IKK, ERK1/2, p38 and JNK pathways*. Eur J Pharmacol, 2006. 542(1-3): p. 1-7.
 18. Kwak, H.B., et al., *Tanshinone IIA suppresses inflammatory bone loss by inhibiting the synthesis of prostaglandin E2 in osteoblasts*. Eur J Pharmacol, 2008. 601(1-3): p. 30-7.
 19. Wu, T.W., et al., *Effect of sodium tanshinone IIA sulfonate in the rabbit myocardium and on human cardiomyocytes and vascular endothelial cells*. Biochem Pharmacol, 1993. 46(12): p. 2327-32.
 20. Wu, W.Y., et al., *Sodium tanshinone IIA silate inhibits oxygen-glucose deprivation/recovery-induced cardiomyocyte apoptosis via suppression of the NF-kappaB/TNF-alpha pathway*. Br J Pharmacol, 2013. 169(5): p. 1058-71.
 21. Yuan, S.L., et al., *Growth inhibition and apoptosis induction of tanshinone II-A on human hepatocellular carcinoma cells*. World J Gastroenterol, 2004. 10(14): p. 2024-8.
 22. Wang, X., et al., *Potential anticancer activity of tanshinone IIA against human breast cancer*. Int J Cancer, 2005. 116(5): p. 799-807.
 23. Liu, M.Z., Y.S. Huang, and W.Q. Xiao, *[No promoting effects of sodium tanshinone II-A sulfonate on growth and metastasis of Lewis carcinoma]*. Zhongguo Yao Li Xue Bao, 1991. 12(6): p. 534-7.
 24. Wang, J., et al., *Promising therapeutic effects of sodium tanshinone IIA sulfonate towards pulmonary arterial hypertension in patients*, in J Thorac Dis. 2013. p. 169-72.
 25. Xu, Y., et al., *Sodium tanshinone IIA sulfonate protects mice from ConA-induced hepatitis via inhibiting NF-kappaB and IFN-gamma/STAT1 pathways*. J Clin Immunol, 2008. 28(5): p. 512-9.