

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	: 角膜經化學傷害後促進修復與抑制血管新生之分析
------------	--------------------------

執行計畫學生：胡宇清
學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-042-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：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 108年03月30日

角膜經化學傷害後促進修復與抑制血管新生之分析

一、摘要

先前本實驗室已研究蟬花萃取物對於乾眼症的作用，發現其可改善淚液品質及降低腺體的傷害，對角膜損傷也具有良好的修復效果。本計畫欲延續先前的研究，為針對角膜血管新生之抑制，探討小葉葡萄及白藜蘆醇之功效分析。本研究目的在藉由眼表照片及組織切片探討一些有效成分對角膜經化學傷害後促進修復與抑制血管新生之作用。

以 ICR 小鼠為實驗動物，鹼傷害(Alkali Burn)化學傷害為造症方法。在鹼傷害的組別中，在傷害前先給予三天的蟬花、小葉葡萄、白藜蘆醇餵食，並於第一天使用 1N NaOH 進行傷害後並持續餵食十天。實驗過程中針對眼表的傷害程度，於第 0、4、7、10 天進行眼表拍照並分析血管新生的程度，同時於實驗最後一天收集眼睛進行後續組織切片分析。

初步結果顯示，在眼表拍照結果中，隨著時間增加，鹼傷害角膜上皮有修復的現象，但其基質層水腫的現象及角膜血管新生則更為嚴重，給予蟬花有效成分後，在角膜上皮有較明顯的修復及降低血管新生的情形；給予小葉葡萄及白藜蘆醇皆能夠減緩血管新生的狀況。

利用免疫組織化學染色 (IHC) 觀察血管新生相關細胞因子的表顯情形，以及利用末端脫氧核苷酸轉移酶脫氧尿苷三磷酸切口末端標記 (TUNEL) 觀察細胞凋亡的情形。除此之外，還要使用 Whole Mount 分析血管新生的狀況。經由本次動物實驗測試，無論在血管新生的眼表觀察、角膜平滑度的結果皆顯示兩種藥物都能減緩 NaOH 造成的傷害。且在組織切片中，使用 HE 染色觀察細胞型態；免疫組織化學染色(IHC stain)、Whole mount 分析 NaOH 傷害的血管新生以及淋巴管情形，此外也觀察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、細胞增生因子表現情形亦有改善。可以幫助確定所篩選的材料是否具有促進角膜修復與抑制血管新生之效果，並可作為後續開發因配戴隱形眼鏡所造成的角膜血管新生抑制劑的先導實驗。

關鍵字：角膜、氯化苯二甲煙銨(BAC)、鹼傷害、血管新生、發炎、小葉葡萄、白藜蘆醇

二. 研究動機與研究問題：

現代人可能因為工作壓力、熬夜、營養素缺乏等因素，造成眼睛佈滿血絲。眼睛持續紅腫發炎，很容易導致病變，而加上隱形眼鏡的大量使用，更加促進了角膜的病變，在病變的過程中，血管新生的現象是最為廣泛卻又常常被忽視的病變，血管新生最終有極大的可能會影響視力。

很多人都認為眼睛紅紅的僅是外表讓人看起來很疲憊，卻沒有想到是因為角膜發炎、受損而造成的。當血管的生成進入到原本因該透明清澈的角膜，而又有更多血管新生出現時，最終可能導致失明。血管新生(Angiogenesis) 就是一個以原有血管系統為基礎，再發展出新的小血管網而形成一個血流供應系統的生理過程，經常發生在生長發育、傷口癒合及腫瘤細胞的生長等情況。

長時間配戴隱形眼鏡常會導致眼睛產生缺氧的現象，而在身體自癒的過程中會有發炎及血管新生的情形，新生的血管細小不易觀察，且通常是沒有感覺且非常容易被忽視的，在不痛不癢的情況下，一般人就算眼睛充血仍舊會繼續配戴隱形眼鏡，造成眼睛持續缺氧、發炎，等到眼睛感到不舒服，很可能是發炎的程​​度很嚴重，甚至有角膜磨損、感染的情況，使血管新生的情形更加惡化。

另外，在一些工作環境及研究場所中，常常會有機會接觸到毒性化學物質[1]，如不當操作導致液體噴濺、揮發性化學藥品或酸鹼性氣體逸散，若接觸到眼睛常常會導致嚴重的傷害，輕度眼睛灼傷在組織學上可以觀察到角膜上皮細胞脫落、基質層水腫及發炎細胞浸潤等現象，也會誘發血管新生。現今針對眼部灼傷的治療主要在避免傷口感染、抑制發炎反應及血管新生，嚴重者進行角膜移植手術等。本研究主要目標在探討天然中草藥及其有效成分，是否對毒性化學物質所導致​​的眼部傷害具有治療的效果，並進一步去評估其取代現有化學藥物的可能性。

三. 文獻回顧與探討：

A. 角膜：

位於眼球表面，覆蓋在虹膜、瞳孔、前房上。為眼睛提供大部分屈光力，加上晶體的屈光力，光線便可準確地聚焦在視網膜上構成影像。

角膜中央部分較薄，旁邊較厚，有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。以下表格為角膜的分層介紹：

角膜分層結構與功能：	
上皮(Epithelium)	由底部到表層，分別是柱狀細胞

	(Columnar cells)、翼狀細胞(Wing cells)、與表面細胞(Surface cells)，此層細胞會不斷地進行脫落、更新。
柏曼氏層(Bowman's layer)	又稱前彈力層(lamina elastic anterior)。一強韌構造。
基質(Stroma)	基質是角膜最厚的構造，約佔整體厚度的 90%。基質由膠原蛋白纖維(Collagen fibrils)、角膜細胞(Keratocytes)與細胞間質(Ground substance)組成。
戴氏膜(Descemet's membrane)	戴氏膜是內皮細胞的基底層(Basal lamina)，角膜內皮細胞附著在戴氏膜之上。
內皮(Endothelium)	由單層的內皮細胞構成，已分化完畢，不會再進行更新或再生，對於維持角膜的含水量、透明度相當重要。

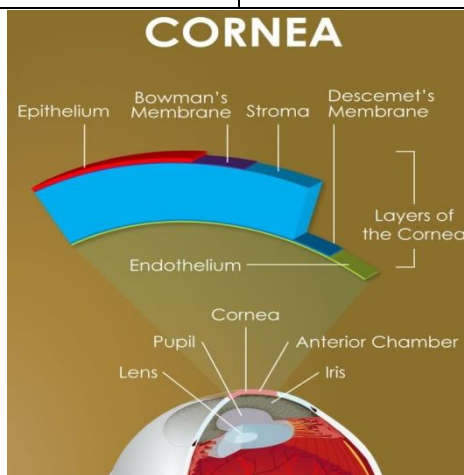


圖 1- 來源：<http://michaelduplessie.com/cornea-transplant/> 搜尋日期:2018/02/20

B. 角膜發炎：

角膜發炎很可能導致血管新生，因為直接與外界接觸，受到損傷及感染的機會較多，本身透明沒有血管組織，其營養主要由角膜周邊血管網、淚水供應，氧氣則由大氣中的氧氣溶在淚液中供給，因此白血球等細胞不容易進入角膜，因此一旦有異物入侵，如：細菌、微生物，就容易產生感染的機會[2]，且病程長、恢復緩慢。一旦角膜發炎造成上皮的損傷[3]，就會使角膜失去透明度進而影響視覺。

C. 血管新生：

血管新生(Angiogenesis) 就是一個以原有血管系統為基礎，再發

展出新的小血管網而形成一個血流供應系統的生理過程，經常發生在生長發育、傷口癒合及腫瘤細胞的生長等情況。

正常由於淚水不易覆蓋眼表面，導致畏光、無法睜開眼睛，及眼睛紅腫等症狀，以及角膜發炎會導致血管通透性增加、靜水壓上升及內皮細胞之間的間隙增加，而促使血管新生，進而發展成細胞浸潤。[11]

血管新生是一種修復的行為，就像身體缺氧，需要血液運送氧氣，或是將發炎細胞及巨噬細胞送到受傷的地方、提供組織修復時所需要的養分及氧氣。[4]正常健康的角膜是透明無血管的，角膜的養分由角膜周邊血管網提供，當有傷口要進行癒合會有血管新生的現象。然而過多的血管新生反而會造成角膜受損的情況更加嚴重，像是纖維化、膠原纖維的沉積、肉芽組織的形成。發炎的過程也會伴隨免疫反應的發生，淋巴系統的調節[5]。

D. 化學傷害

a. Benzalkonium chloride(BZK, BKC, BAC) :

中文名稱為“氯化苯二甲烴銨”，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，常用於手術前皮膚消毒、粘膜炎和傷口消毒，手術器械消毒。且 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。[6]

b. 鹼傷害(Alkali Burn) :

鹼傷害為一種急性的化學傷害，此傷害方式對角膜的損傷相當嚴重。常見的傷害原因為 NaOH，此高腐蝕性強鹼會在眼睛的前段部分，主要是角膜的區域，造成嚴重的發炎現象及傷害。傷害後會迅速的由輪部往角膜中心長出細而緻密的血管，更嚴重甚至會形成血管網，影響角膜的透明度，導致視力受損甚至失明。鹼傷害除了造成血管新生外，也會促使角膜內自由基產生而提高細胞內的氧化壓力進而導致細胞凋亡或是細胞壞死，也就是嚴重的角膜損傷，也可能造成失明。[12] 另外經由鹼傷害會驅動許多訊息因子，像是發炎相關或是血管新生相關的因子，藉由測定此類細胞因子能評估鹼傷害的嚴重程度。[7]

四、研究方法與步驟：

A. 動物飼育

實驗動物為樂斯科公司 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

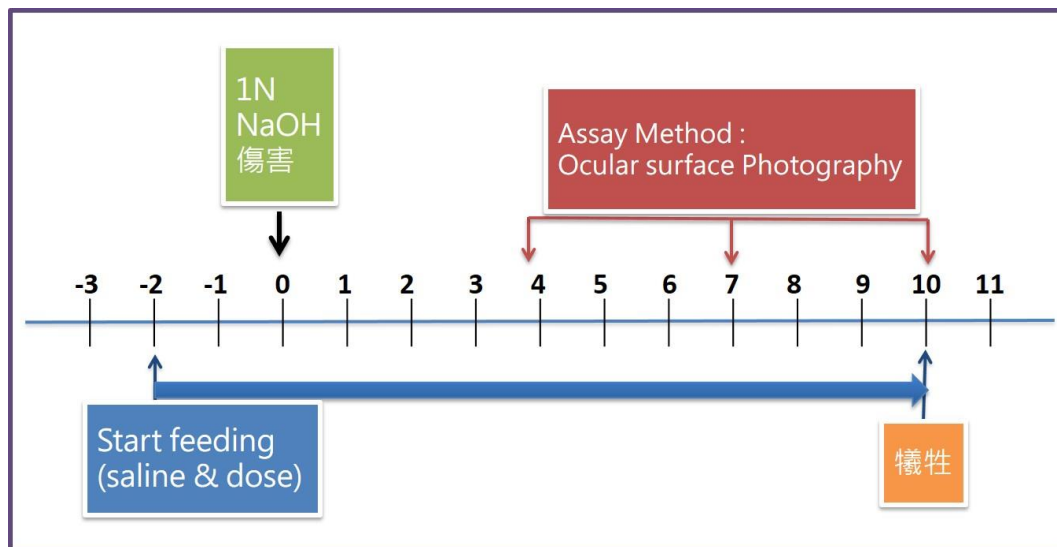
墊料供小鼠溫暖，並保持適當的飼料跟水分。動物房保持室溫 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相對溼度 30~70%之間。光照時間為 12 小時明暗週期。平底盒籠及墊料每週更換一、二次。

B. 實驗流程

本計畫操作的傷害實驗為 NaOH 傷害模式誘導血管新生。根據過去研究了解 NaOH 為誘發血管新生的有效傷害方法。實驗為期十四天，傷害前三天開始持續餵藥，於第一天進行傷害，並於實驗第零天、第四天、第七天，及第十一天犧牲前，拍攝眼表照片觀察血管新生的情況。

本計畫另利用之動物模型，操作兩種功效實驗：(1)小葉葡萄，(2)白藜蘆醇。

分為 Blank(對照組)、1N NaOH、1N NaOH+低濃度小葉葡萄萃取物、1N NaOH+高濃度小葉葡萄萃取物及 1N NaOH+低濃度白藜蘆醇、1N NaOH+高濃度白藜蘆醇。根據過去研究了解 NaOH 為誘發血管新生的有效傷害方法。實驗為期十三天，傷害前三天開始持續餵藥，於第一天進行傷害，並於實驗第零天、第四天、第七天，及第十天犧牲前，拍攝眼表照片觀察血管新生的情況。

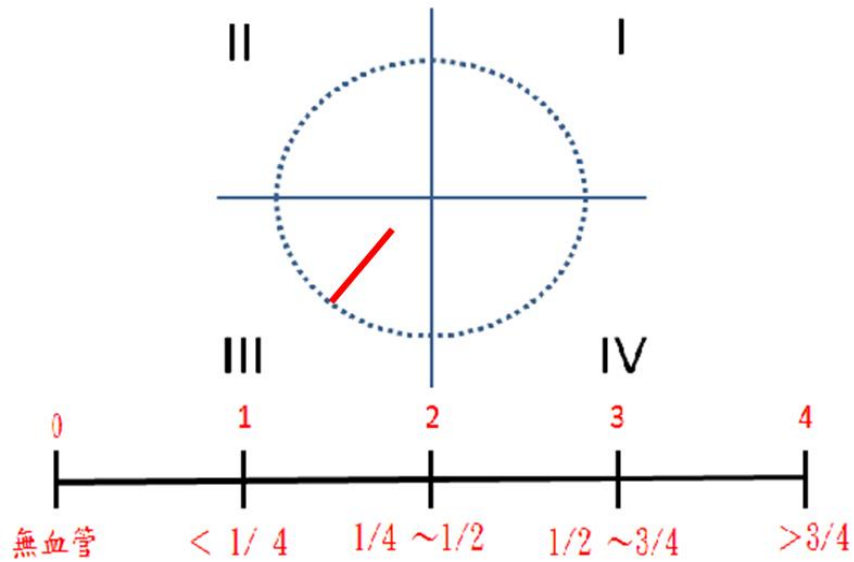


NaOH 傷害方法[10]:將濾紙裁切成小鼠的眼睛大小，浸泡在 1N NaOH 中，之後均勻覆蓋在小鼠的眼睛表面 40 秒做傷害，並在移除濾紙後以 10ml 生理食鹽水進行沖洗。

*血管新生定量標準：

定量的方式根據參考文獻[8]，新生的血管從輪部往角膜中心延伸，

將角膜分為四象限，找出最長的血管作為定量的目標，準則如下：
 0，無新生血管；1，新生血管往角膜中心延伸的距離小於 1/4；2，新生血管往角膜中心延伸的距離位於 1/4-1/2；3，新生血管往角膜中心延伸的距離位於 1/2-3/4；4，新生血管往角膜中心延伸的距離大於 3/4。



後續流程圖：



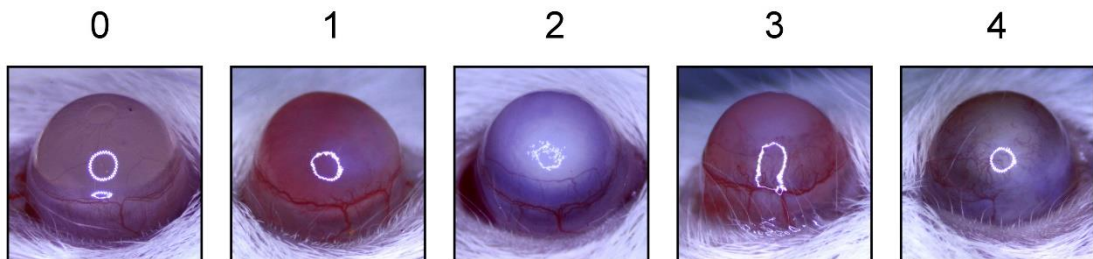
五. 結果：

A. 眼球表面拍照結果：

在眼表照片中，可以發現 NaOH 傷害實驗的組別眼睛表面不平整且有明顯損傷。此外角膜在受傷後同時會影響到角膜的透明度，使其變混濁，此現象亦可從 NaOH 傷害實驗中觀察到明顯的狀況。NaOH 傷害實驗眼睛表面中央與周邊皆因為化學傷害而灼傷，相較於餵藥(小葉葡萄萃取物、白藜蘆醇)的組別，傷害組別形成明顯的血管網，同時有較長且密集的血管出現，而餵藥組別中，血管新生的狀況可看出被抑制，形成的血管網較短，並且血管長度有所減少。在小葉葡萄萃取物及白藜蘆醇兩組中，血管網的生長趨近於局部性而非全面性，反觀血腫，基質水腫等情形外觀上並沒有改善，須做進一步分析才能確定發炎因子是否有被抑制。

組別中，以高濃度白藜蘆醇抑制血管新生的效果從傷害後第四天至第七天及第十天的緩解幅度最顯著。而高濃度小葉葡萄的組別也有呈現越加緩解的趨勢，且效果與高濃度的白藜蘆醇相近，皆有效的緩解血管新生的情形。在餵藥(小葉葡萄萃取物、白藜蘆醇)的組別裡，隨著餵藥天數增加，皆可以觀察到血管新生被抑制的情況。

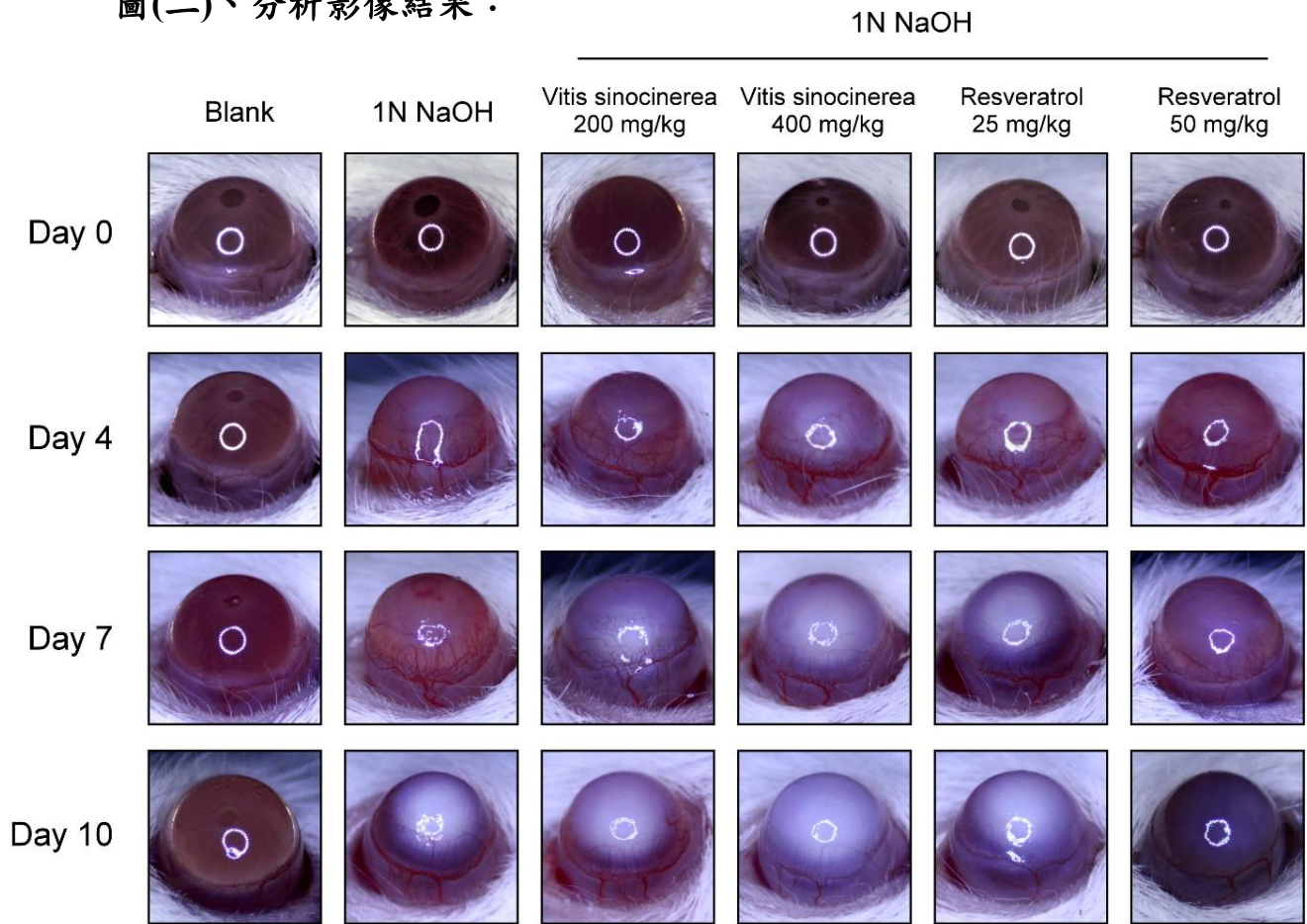
圖(一)、分級示意圖：



圖(一)為分級方式：新生的血管從輪部往角膜中心延伸，將角膜分為四象限，找出最長的血管作為定量的目標。準則如下：

0，無新生血管；1，新生血管往角膜中心延伸的距離小於 1/4；2，新生血管往角膜中心延伸的距離位於 1/4-1/2；3，新生血管往角膜中心延伸的距離位於 1/2-3/4；4，新生血管往角膜中心延伸的距離大於 3/4。

圖(二)、分析影像結果：

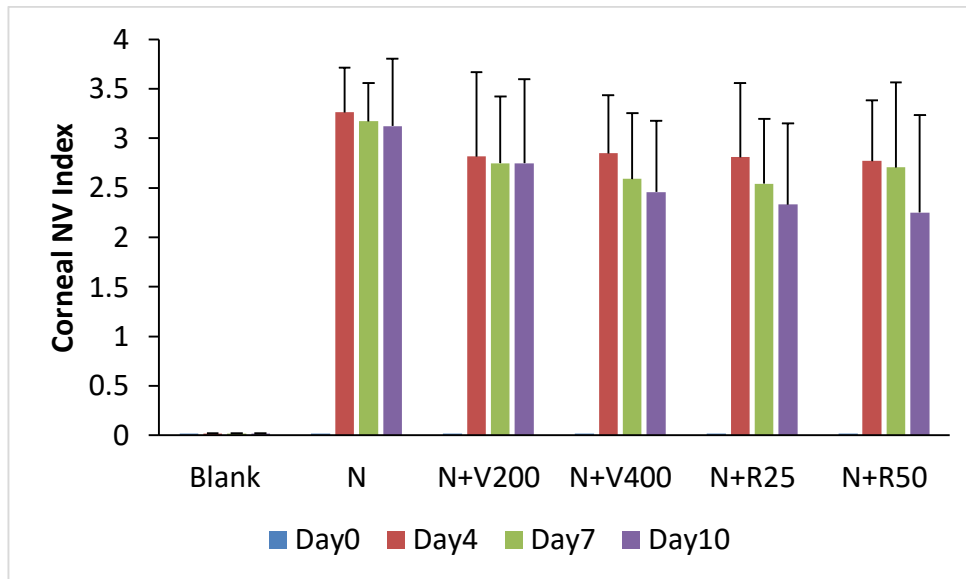


圖(二)為眼睛表面拍照結果分析，由傷害後第四天可看出各組血管皆
有被誘導出，餵藥(小葉葡萄萃取物、白藜蘆醇)在第七天即可看出與
傷害組在血管新生的差異。第十天犧牲時可以看出 NaOH 傷害各組眼
表的修復情形，NaOH 傷害組的血管較其他組別更為明顯且長度更長，
高劑量小葉葡萄萃取物可明顯看出抑制血管新生的效果，與高劑量白
藜蘆醇相仿；低劑量小葉葡萄萃取物即有抑制血管新生的效果。

Blank: 控制組 NaOH: 傷害組 Vitis sinocinerea: 小葉葡萄

Reveratrol: 白藜蘆醇

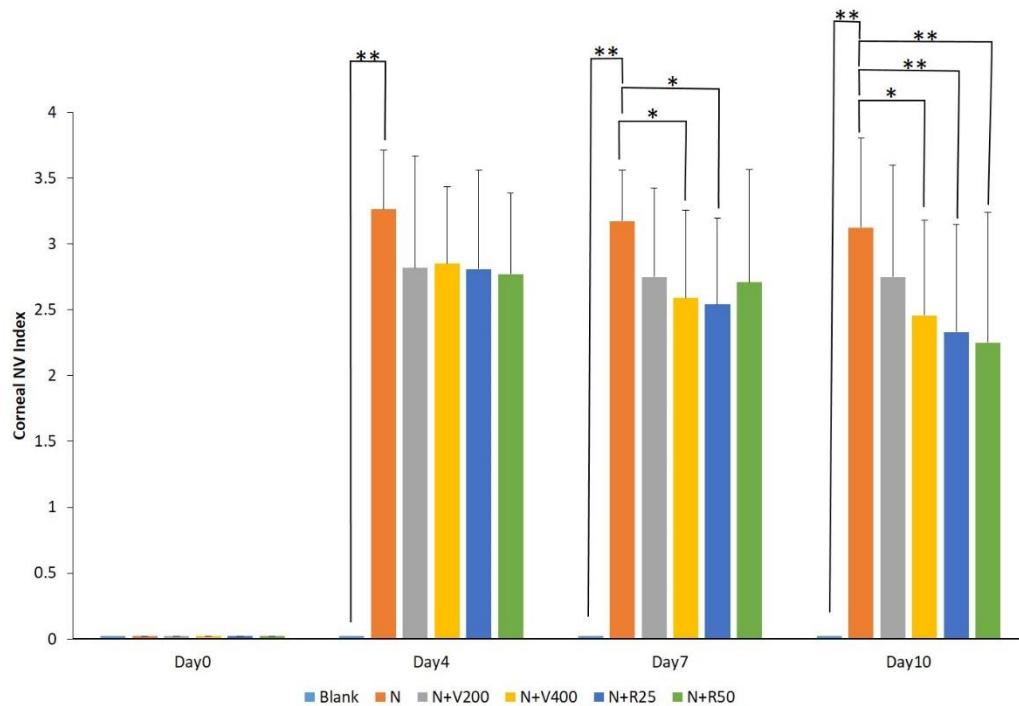
圖(三)、血管定量結果(以組別為橫軸)：



圖(三)為血管定量結果。組別中，以高濃度白藜蘆醇抑制血管新生的效果最為顯著，傷害後第十天的緩解幅度最明顯。而高濃度小葉葡萄萃取物的組別也有呈現越加緩解的趨勢。在餵藥(小葉葡萄萃取物、白藜蘆醇)的組別裡，隨著餵藥天數的增加，血管新生的情況逐漸好轉。

Blank: 控制組 N: NaOH 傷害組 N+V200: 傷害加上低濃度(200mg/kg)小葉葡萄萃取物 N+V400: 傷害加上高濃度(400mg/kg)小葉葡萄萃取物 N+R25: 傷害加上低濃度(25mg/kg)白藜蘆醇 N+R50: 傷害加上低濃度(50mg/kg)白藜蘆醇

圖(四)、血管定量結果(以天數為橫軸)：



圖(四)為血管定量結果。以天數來看，整體組別在傷害後第十天與第四天相比皆有良好的緩解效果。而在第十天中白藜蘆醇的組別相較於小葉葡萄萃取物的組別有較好的抑制血管新生的情形。

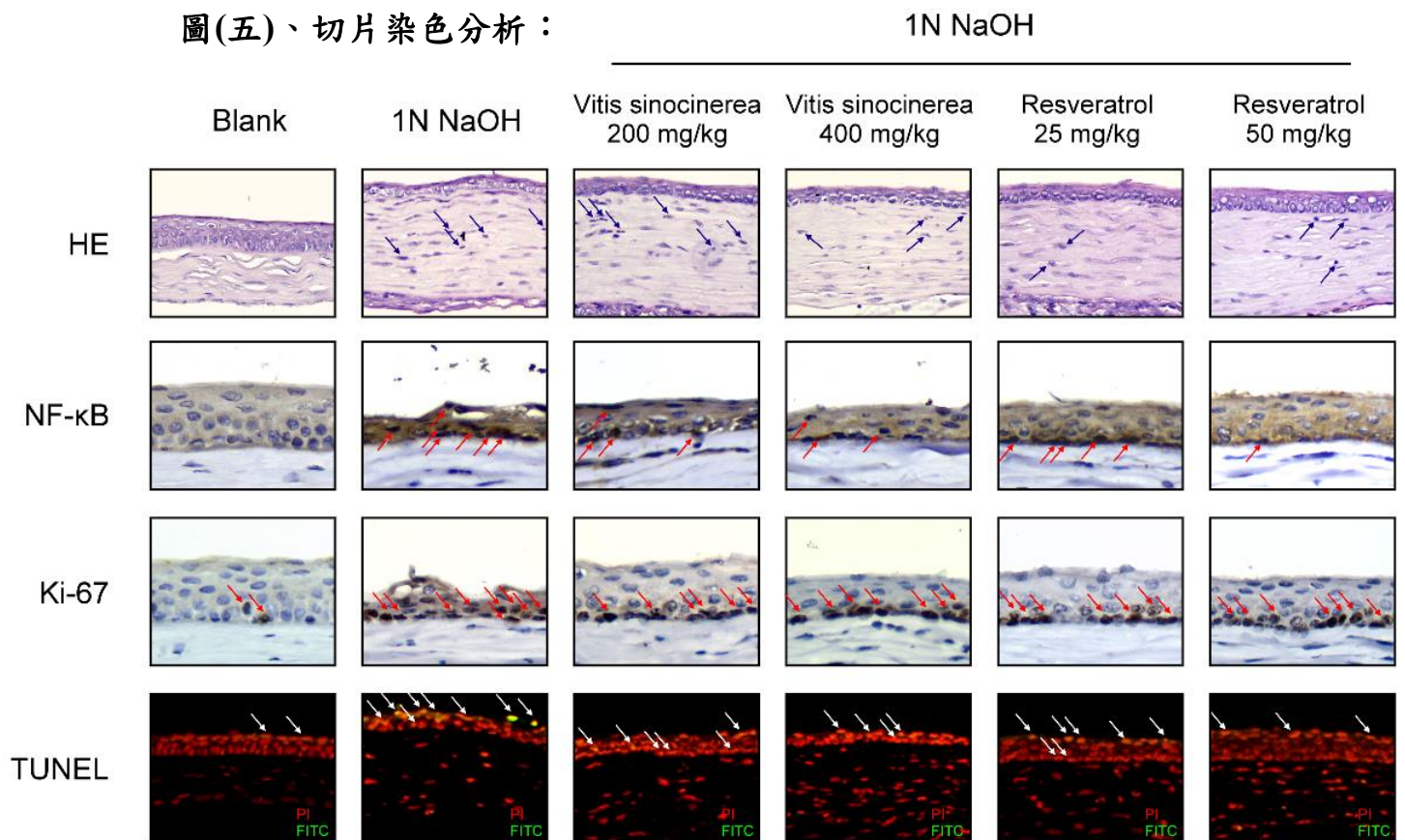
Blank: 控制組 N: NaOH 傷害組 N+V200: 傷害加上低濃度(200mg/kg)小葉葡萄萃取物 N+V400: 傷害加上高濃度(400mg/kg)小葉葡萄萃取物 N+R25 傷害加上低濃度(25mg/kg)白藜蘆醇 N+R50: 傷害加上低濃度(50mg/kg)白藜蘆醇

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

B.組織病理切片結果：

由 H&E 染色結果中發現，NaOH 傷害組的角膜上皮細胞受損嚴重且排列混亂，同時基質層浸潤情形以及水腫的程度也相當顯著，甚至有肉芽組織生成。經由給予藥物(小葉葡萄萃取物、白藜蘆醇)後可以明顯觀察到，角膜的受損及浸潤情形有所下降。總觀各個方面可知小葉葡萄萃取物、白藜蘆醇在角膜上有修復之作用。利用 IHC 染色分析發炎反應以及細胞增生的情形。發炎因子 NF-Kb 的結果顯示，NaOH 傷害組的訊號明顯多於餵藥組別，顯示出藥物能夠減緩角膜發炎情形；藉由 ki-67 觀察細胞增生，在傷害後，細胞增生的情形顯示，具有增生能力的細胞皆遠多於正常組，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大量出現，而在餵藥的組別中，具有增生能力的細胞維持在基底層並沒有向上移動，猜測因藥物的給予減緩傷害情形而使具增生能力的細胞較為穩定。在 IHC 染色結果中顯示，小葉葡萄萃取物與白藜蘆醇的抗發炎以及角膜上皮修復效果相仿。利用 TUNEL 分析細胞凋亡情形。在受到 NaOH 傷害後第十天的分析結果顯示，角膜上皮細胞凋亡情形在十天的傷害修復後並沒有減緩，而在餵藥後，細胞凋亡情形有明顯減少，角膜細胞凋亡的情形在餵藥組別中，遠小於 NaOH 傷害組，同時白藜蘆醇的效果又比小葉葡萄萃取物更加明顯，可知兩種藥物對於細胞凋亡皆有抑制效果。

圖(五)、切片染色分析：



圖(五)為組織病理切片染色結果。

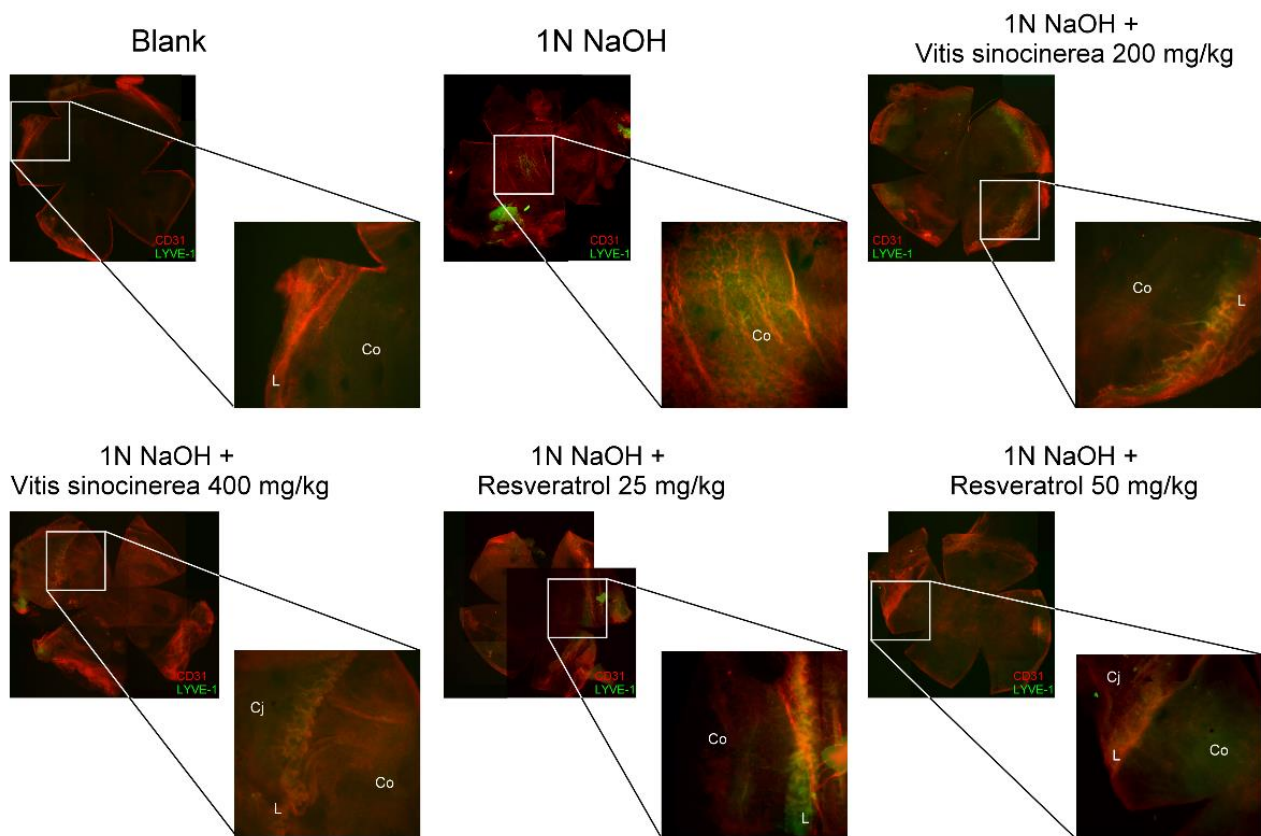
圖中的藍色箭頭為細胞浸潤。紅色箭頭因為 NF- κ B、Ki-67 訊號。白色箭頭所指為凋亡的細胞，

由 H&E 染色結果中發現，NaOH 傷害組的角膜上皮細胞受損嚴重且排列混亂，尤其是中央區域厚度明顯降低，同時基質層浸潤情形以及水腫的程度也相當顯著，甚至有肉芽組織生成。經由給予藥物(小葉葡萄萃取物、白藜蘆醇)後可以明顯觀察到，上皮細胞受損有所降低，角膜的浸潤情形也有所下降。而高劑量組相對之下可以觀察到修復的現象，總觀各個方面，在中央角膜中角膜上皮厚度、基質層經由餵藥後有緩解的趨勢，可知小葉葡萄萃取物、白藜蘆醇在角膜上有修復之作用。

利用 IHC 染色分析發炎反應以及細胞增生的情形。NF- κ B 是由 p50 和 p65 所形成的 heterodimer(異質體)，未活化的發炎因子 NF- κ B 在細胞質，遇到發炎激素(proinflammatory cytokine)、氧化自由基(reactive oxygen species)等等會活化，活化的 NF- κ B 會進入細胞核與基因結合，吸引共活化因子(coactivator)促進轉錄，進而影響基因表現。發炎因子 NF- κ B 的結果顯示，NaOH 傷害組的訊號明顯多於餵藥(小葉葡萄萃取物、白藜蘆醇)的組別，顯示出藥物能夠減緩角膜發炎情形；此外藉由觀察細胞增生的細胞激素(ki-67)，發現控制組中，因為沒有受損，被誘導出增生能力的細胞較少。而在其他組別中，細胞增生的情形因 NaOH 的傷害造成角膜上皮的受損，無論是中央角膜、周邊角膜，具有增生能力的細胞皆遠多於正常組，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大量出現，而在餵藥的組別(小葉葡萄萃取物、白藜蘆醇)中，具有增生能力的細胞維持在基底層並沒有向上移動，因為正常有增生能力的細胞為由下往上移動，推測因藥物的給予減緩傷害情形而使具增生能力的細胞較為穩定。在 IHC 染色結果中顯示，小葉葡萄萃取物與白藜蘆醇的抗發炎以及角膜上皮修復效果相仿。

利用 TUNEL 分析細胞凋亡情形。當細胞受損時，細胞會走向凋亡路徑。在 NaOH 傷害組中，在受到 NaOH 傷害後第十天的分析結果顯示，角膜上皮細胞凋亡情形(黃色螢光)，在十天的傷害修復後並沒有減緩，而在餵藥(小葉葡萄萃取物、白藜蘆醇)的組別中，細胞凋亡情形有明顯減少，角膜細胞凋亡的情形在餵藥組別中，遠小於 NaOH 傷害組，同時白藜蘆醇的效果又比小葉葡萄萃取物更加明顯，可知兩種藥物對於細胞凋亡皆有抑制效果。

圖(六)、Whole mount 染色結果：



圖(六)為 Whole mount 染色結果可以清楚觀察角膜血管新生的情況。途中紅色螢光為血小板-內皮細胞黏附分子(CD31)，綠色螢光為觀察淋巴管生長之分子(LYVE-1)。

本次實驗藉由螢光染色分別觀察血管(CD31)以及淋巴管(LYVE-1)在以 NaOH 為化學傷害後，兩者生長的情況。為了修復傷害促進角膜修復，角膜會誘發血管新生。在 NaOH 傷害組中，可以看到密集的血管新生在中央角膜區，反而會造成角膜透明度的下降進而引起視力衰退，發炎的過程也會伴隨免疫反應的發生，淋巴系統的調節，也能觀察到淋巴管顯著增生的情形。而餵藥的組別(小葉葡萄、白藜蘆醇)可以發現由周邊生長至中央的血管相較於傷害組別，血管縮短許多。又以高濃度的白藜蘆醇組別，血管新生抑制的效果最為顯著。

討論.

現代人時常有眼睛疲勞的問題，眼睛佈滿血絲甚至紅腫發炎，很容易有眼部發炎的情形，而加上現代隱形眼鏡的大量使用，促使角膜缺氧，更加造成了角膜的傷害，進而加速了角膜的病變，在病變的過程中，血管新生的現象是非常廣泛卻又常常被忽視的病變，血管新生最終有極大的可能會影響角膜的透明度，造成視力的下降。

回顧先前的文獻，已經有部分研究致力於探討抑制血管新生的藥物以及預防方法。而白藜蘆醇為已知對血管新生及抗發炎有緩解作用的一種藥物。小葉葡萄（*Vitis sinocenera*）為葡萄科葡萄屬多年生落葉蔓性藤本植物，是民間常用的保健藥草，莖葉性甘、平，主治眼疾、風濕、腎虧，亦治肺疾、乳癱、無名腫毒。許多科學研究顯示氧化壓力的傷害會造成包括癌症、肝病、老化等疾病，小葉葡萄葉片促取物中含有亦含有白藜蘆醇。本研究主要目標在探討天然中草藥，是否對毒性化學物質所導致的眼部傷害具有治療的效果，並進一步去評估其取代現有化學藥物的可能性。

本實驗中利用中草藥來觀察其修復和改善狀況，藉由免疫組織化學染色（IHC）觀察血管新生相關細胞因子的表現情形，以及利用末端脫氧核糖核苷酸轉移酶脫氧尿苷三磷酸切口末端標記（TUNEL）觀察細胞凋亡的情形。除此之外，也使用 Whole Mount 分析血管新生以及淋巴管新生的狀況。經由本次動物實驗測試，無論在血管新生的眼表觀察、角膜平滑度的結果皆顯示兩種藥物都能減緩 NaOH 造成的傷害。且在組織切片中，使用 HE 染色觀察細胞型態；免疫組織化學染色(IHC stain)、Whole mount 分析 NaOH 傷害的血管新生以及淋巴管情形，此外也觀察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、細胞增生因子表現情形亦有改善。而在 Whole mount 中染色顯示，因受傷引起的血管以及淋巴管在藥物的介入後，達到減緩的效果，說明在角膜血管新生，利用白藜蘆醇以及小葉葡萄結能夠有效抑制；同時淋巴管新生情形也能緩解，表明發炎情形有效降低。

異常的血管新生與許多眼部表面的疾病相關，像是角膜發炎或創傷性角膜疾病。正常角膜是光滑且無血管的，角膜若長期缺氧、慢性或急性損傷皆有可能發生新生血管的增生現象。而血管新生是為了修復受傷及發炎的組織，若在適度的範圍內生長且未影響視力上無大礙，但若超過一定限度或是時間過長，結會造成不可逆的傷害，例如造成角膜纖維化，翼狀息肉的產生，結會引起勢力的大幅衰退。而血管新生的過程通常是沒有異狀的，經常是在已影響視力或已無法修復才發現。所以更應該在未有感受時加以預防，使新生的血管達到促進傷口

癒合的效果，但並不造成更嚴重、不可逆的情況。

本次實驗結果可以幫助確定所篩選的材料是否具有促進角膜修復與抑制血管新生之效果，並可作為後續開發因配戴隱形眼鏡所造成的角膜血管新生抑制劑的先導實驗。後續在相關研究將會著重在抑制隱形眼鏡的佩帶所造成的角膜缺氧性血管新生，並逐步完善抑制角膜血管新生的課題。

六、參考文獻

1. Fang Bian, Flavia S. A. Pelegriño, Stephen C. Pflugfelder, Eugene A. Volpe, De-Quan Li, and Cintia S. de Paiva Desiccating Stress-Induced MMP Production and Activity Worsens Wound Healing in Alkali-Burned Corneas *Cornea Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:4908–4918.
2. Nicole M. Broekema, Inna V. Larsen, Erika S. Naruzawa, Marcin Filutowicz, Aaron W. Kolb, Leandro B. C. Teixeira, and Curtis R. Brandt et al. A Mouse Model of Multi-Drug Resistant *Staphylococcus aureus*-induced Ocular Disease HHS Public Access Author manuscript *J Ocul Biol.* Published in final edited form as: *J Ocul Biol.* 2016 November ; 4(2)
3. Sabine Kling, Arthur Hammer¹, Alain Conti¹, and Farhad Hafezi¹ Corneal Cross-Linking with Riboflavin and UV-A in the Mouse Cornea in Vivo: Morphological, Biochemical, and Physiological Analysis *translational vision science & technology Trans Vis Sci Tech.* 2017; 6(1):7, doi:10.1167/tvst.6.1.7
4. Kyu-Yeon Han, Jennifer A. Tran, Jin-Hong Chang, Dimitri T. Azar¹ & James D. Zieske Potential role of corneal epithelial cell-derived exosomes in corneal wound healing and neovascularization *Scientific Reports* | 7:40548 | DOI: 10.1038/srep40548
5. Kim KA, Hyun LC, Jung SH, Yang SJ. The leaves of *Diospyros kaki* exert beneficial effects on a benzalkonium chloride–induced murine dry eye model *Molecular Vision* 2016; 22:284-293 Published 2 April 2016
6. Hyun-Soo Lee, Reza Dana et al. Involvement of Corneal Lymphangiogenesis in a Mouse Model of Allergic Eye Disease *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:3140–3148. DOI:10.1167/iovs.14-16186
7. XUE-JUN GU, XIAN LIU et al. Involvement of NADPH oxidases in alkali

burn-induced corneal injury. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE 38: 75-82, 2016

8. Zhirong Lin, Huan He, Tong Zhou, Xiaochen Liu, Yihui Wang, Hui He, Huping Wu, and Zuguo Liu A Mouse Model of Limbal Stem Cell Deficiency Induced by Topical Medication With the Preservative Benzalkonium Chloride Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013;54:6314–6325.
9. Sei Yeul Oh, Jong-Sun Choi, Eo-Jin Kim, Roy S. Chuck, Choul Yong Park The role of macrophage migration inhibitory factor in ocular surface disease pathogenesis after chemical burn in the murine eye Molecular Vision 2010; 16:2402-2411
10. Matilda F. Chan, and Zena Werb Animal Models of Corneal Injury Bio Protoc. 2015 July 5; 5(13): e1516–.
11. Yun Han, Mei Shen, Li-Yuan Tang Antiangiogenic effects of catalpol on rat corneal neovascularization MOLECULAR MEDICINE REPORTS 17: 2187-2194, 2018
12. Chastain Anderson, Qinbo Zhou, Shusheng Wang An Alkali-burn Injury Model of Corneal Neovascularization in the Mouse Journal of Visualized Experiments 2014