

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 咖啡因對淚液分泌量的影響及其對淚腺中的 P1 purinergic receptors (A1, A2A, and A2B)之作用機 制分析
------------	--

執行計畫學生： 高于雯

學生計畫編號： MOST 107-2813-C-040-038-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： 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 108年03月31日

咖啡因對淚液分泌量的影響及其對淚腺中的 P1 purinergic receptors (A1, A2A, and A2B)之作用機制分析

(一)、 摘要

「乾眼症」是眼科門診相當常見的疾病之一，長期會造成角結膜病變，並會影響視力。乾眼症如果不使用藥物(包含人工淚液或淚膠)緩解，常以一些物理學(例如按摩、熱敷或用遠紅外線)或特殊飲食等療法替代。最近有兩篇臨床研究報告指出攝食咖啡因會增加淚液分泌量，但是因為都是小型實驗，亦缺乏作用機制探討，且咖啡因是 P1 purinergic receptors 拮抗劑，理論上反而會抑制淚液分泌，因此有許多研究者抱持懷疑態度，另外，目前也沒有咖啡因影響淚液分泌的動物模式，因此本計畫擬建立咖啡因影響淚液分泌的動物模式，並且探討咖啡因對淚液分泌量的影響及其對淚腺中的 P1 purinergic receptors (A1, A2A, and A2B)之作用機制分析，以及在短期與中期其對淚腺的誘發發炎效應。實驗分為三批，一批四組，每一組三隻 ICR 母鼠，共三十六隻小鼠：第一批小鼠為空白控制組(0 min)，直接做淚液量測試(Tear Volume)(TV)與淚液膜破裂時間測試(Tear Break Up Time)(TBUT)，測試後即犧牲以取下外淚腺，左右淚腺分別包埋切片與進行西方墨點分析 NF- κ B、Cox-2、iNOS，觀察是否有發炎的狀況產生，並且分析 P1 purinergic receptors (A1, A2A, and A2B)之表現狀態；第二批小鼠為短期組(30 min)，於餵食 5、15、30 mg/kg 咖啡因 30 分鐘後做淚液量測試與淚液膜破裂時間測試並犧牲，左右淚腺分別包埋切片與進行西方墨點分析，分析方法與空白控制組相同；第三批小鼠為中期組(240 min)，也是於餵食 5、15、30 mg/kg 咖啡因 240 分鐘後做淚液量測試與淚液膜破裂時間測試並犧牲，左右淚腺分別包埋切片與進行西方墨點分析。本計畫可以回答下列問題：(1)攝食咖啡因是否會增加淚液分泌量？其劑量需要多少？；(2)攝食咖啡因是否會改善淚液品質？；(3)攝食有效劑量咖啡因，會對淚腺中的 P1 purinergic receptors (A1, A2A, and A2B)表現量產生甚麼影響？；(4)攝食有效劑量咖啡因是否會導致淚腺發炎還是抑制發炎？短期(30 min)、中期(240 min)效應是否有差別？預計本計畫將對咖啡因影響淚液分泌的效應與機制提供明確的初步結果，且建立動物模式後有利於後續針對長期攝食咖啡因影響乾眼症狀的相關研究。

關鍵詞： 咖啡因、乾眼症、淚液量、淚腺、P1 purinergic receptors、作用機制

(二)、 研究動機與研究問題

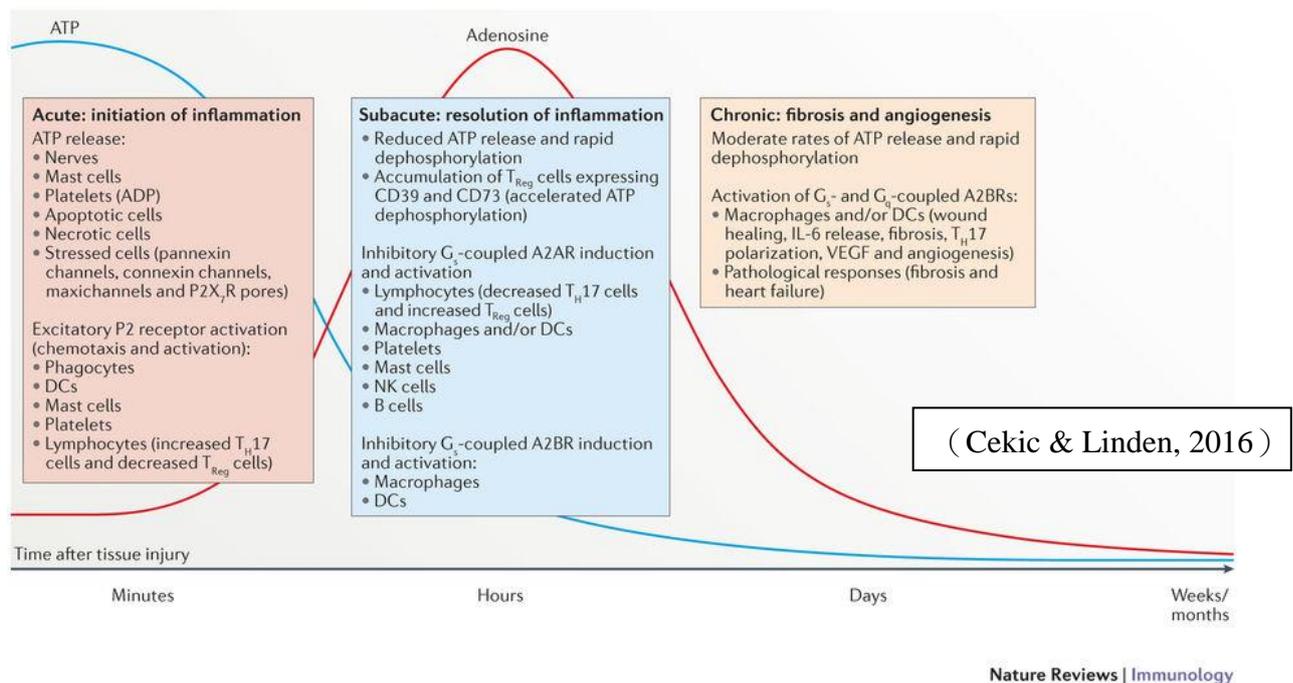
「乾眼症」是眼科門診相當常見的疾病之一，在台灣整體罹患率大約 4.87% (Yen et al, 2015), 65 歲以上人口約 33.7% 罹患率(石牌研究)(Lin et al., 2003)。常見之乾眼症的症狀包括眼睛乾澀、容易疲倦、想睡、會癢、有異物感、痛灼熱感、眼皮緊繃沉重、分泌物黏稠、怕風、畏光、對外界刺激很敏感、暫時性視力模糊、有時眼睛太乾，基本淚液不足反而刺激反射性淚液分泌而造成常常流眼淚之症狀；較嚴重者眼睛會紅、腫、充血、角質化，角膜上皮破皮而有絲狀物黏附，長期之傷害則會造成角結膜病變，並影響視力。

針對乾眼症的症狀改善，如果不使用藥物(包含人工淚液或淚膠)緩解，常有一些物理學(例如按摩、熱敷或用遠紅外線)或特殊飲食等療法替代。例如最近有兩篇臨床研究(Osei et al., 2003; Arita et al., 2012) 指出攝食咖啡因會增加淚液分泌量，未來或許能用來治療乾眼症。以 Arita et al. (2012) 的研究來說，受試者以 78 位正常分泌淚液的人來進行。研究人員讓參與者參加兩次聚會，第一次聚會時給他們咖啡因或是安慰劑膠囊，咖啡因量依各人體重而定，例如，127-165 磅的人服用 400 mg 咖啡因膠囊；一杯 8 盎司的咖啡約有 100 mg 咖啡因。相隔不到 6 天再聚會一次，並給他們另一個膠囊，原先服用咖啡因的改給安慰劑。結果發現，每個人服用咖啡因後的眼淚量都比服用安慰劑後多。但是 Arita et al. (2012) 並未提出咖啡因顯然會增加眼淚量的作用機制，另外一篇 Osei et al. (2003) 的報告僅用 41 位受試者進行測試，也被認為是一個小型實驗，再者，這兩個臨床試驗都缺少作用機制的探討，因此有許多研究者對咖啡因是否真能促進淚液分泌進而緩解乾眼症狀仍然抱持懷疑態度。

為了解咖啡因增加眼淚量的作用機制，查詢 NCBI PubMed 後發現目前並沒有咖啡因和淚液分泌相關的動物模式報告，有趣的是在 Arita et al. (2012) 的論文中提及不同的 adenosine A2a receptor 基因多型性會對咖啡因誘發淚液量有不同的效應。是否在控制淚液量最主要的淚腺(lacrimal gland)上有 adenosine A2a receptor，因而造成不同的刺激作用？進一步查詢 NCBI PubMed 後發現，淚腺會受到 ATP/ATP metabolites 誘發而增加淚液分泌(Sasaki and Gallacher, 1992)，其影響是受到後來歸類於 P1 purinergic receptors (包含 A1, A2A, and A2B, P2X1 - 7 receptors) 的影響，且這些 receptors 都有在淚腺(lacrimal gland)上有表現(Edman et al., 2008; Robin et al., 2016)。咖啡因是 adenosine 的 antagonist/inhibitor (Ribeiro and Sebastião, 2010)，理論上，咖啡因的作用應該是與 adenosine 相反，也就是會抑制淚液分泌才對，可是先前的臨床試驗的結果指出反而是促進淚液分泌，這個疑問有需要進一步分析加以釐清。

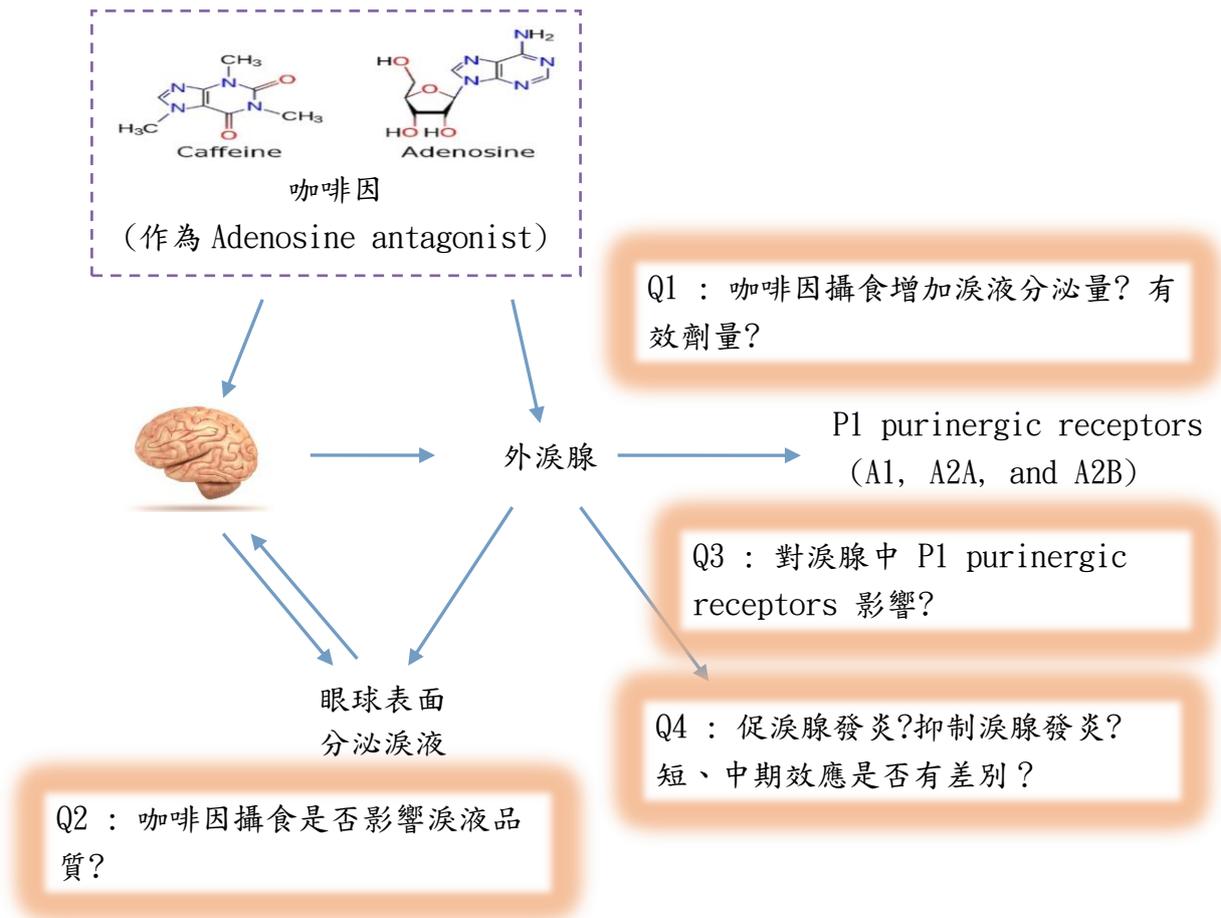
另外查到有趣的是，male NOD (non-obese diabetes) 老鼠有先天性的乾眼症狀，這些小鼠在 12 周時乾眼症狀加劇且同時會有相對於正常 Balb-c 小鼠更多 (2.5 倍) 的 A2a receptor 在淚腺表現 Sanderson et al., 2014)，是否為乾眼所

誘發的代償作用，有待進一步分析。因此，在攝食咖啡因的狀況下，P1 purinergic receptors (主要是 A1, A2A, and A2B) 在淚腺上的表現量有何變化是值得探討的問題。另外，在文獻上 P1 purinergic receptors 活化後，下游的作用包含急性期的發炎反應 (例如 60 分鐘內)，以及中期 (例如 240 分鐘) 的抑制發炎反應，咖啡因做為 adenosine receptors (ARs) 的 antagonist，是否會緩解或是誘發淚腺中的發炎反應，在急性期 (60 分鐘內)，以及中期 (240 分鐘) 的反應是否有差異，也是值得探討的問題。



基於以上的文獻查閱，再加上進老師實驗室後一直學習乾眼症小鼠相關的實驗技術，對小鼠的乾眼研究模式已經累積相當的經驗，也在國內外的研討會上發表過數篇海報論文。本計畫提出以小鼠餵食咖啡因作為動物模式，要進行的研究及要回答的問題包含(Questions 1 - 4 如下圖示)：

1. 建立咖啡因攝食誘發小鼠淚液分泌的研究模式，以回答攝食咖啡因是否會增加淚液分泌量？其劑量需要多少 mg/kg of body weight？
2. 攝食咖啡因是否會改善淚液品質？
3. 攝食有效劑量的咖啡因，會對淚腺中的 P1 purinergic receptors (A1, A2A, and A2B) 表現量產生甚麼影響？
4. 攝食有效劑量的咖啡因是否會導致淚腺發炎還是抑制發炎？短、中期效應是否有差別？



(三)、 文獻回顧與探討

1. 淚液的組成及功用

正常的眼睛表面有一層淚液層，經由眨眼的動作而使淚液均勻分布於眼球表面與結膜上，最後經由鼻淚管排除掉。淚液層由外而內可分為三層：

(1) 油脂層：由眼瞼之瞼板腺分泌。主要由蠟質、膽固醇、磷脂、甘油三酯等組成。功用為增加淚液膜表面張力，延緩淚液蒸發，並潤滑眼瞼與眼球表面。

(2) 水液層：在小鼠中主要以外淚腺(ELG)分泌，占淚液膜最大部分。主要由水、無機鹽、有機物、tear lipocalin、lactoferrin、lysozyme 與 lacritin 等組成；功用為潤滑、清晰眼睛的表面，提供角膜氧氣，並有殺菌與清除代謝產物之功用。

(3) 黏液素層：主要由結膜上皮杯狀細胞分泌。在角膜上皮層與淚水之間形成親水界面，起到營養、保護角膜、平滑角膜、使淚液能均勻分布在角結膜表面。

這三層淚液如果有一層分泌不足或是分布不均勻，都會造成乾眼之症狀：

(1) 黏液素層分泌不足：缺乏維他命 A、慢性結膜炎、類天皰瘡、化學性灼傷等等所引起的結膜結疤，使結膜上皮細胞角質化進而使黏液素分泌減少。

(2) 油脂層分泌不足：眼瞼發炎造成油脂缺乏、眼瞼結構不完整造成閉合不良，因而淚膜保護不足。

(3) 淚液過度蒸發、淚膜分佈不均勻：角膜疾病使得角膜不平滑、甲狀腺眼疾、眨眼次數減少（如長時間開車、一直看電視、打電腦）、長時間在冷氣房或戶外強風燥熱的環境。

參考資料：

認識乾眼症：<https://goo.gl/ybl8l>

簡單認識淚膜（tear film）：<https://goo.gl/eFnhAB>

2. 淚液品質 (Tear Break up time)(TBUT) 與 淚液量 (Tear Volume)(TV) 之分析

- 淚液分泌檢查 (TV)

利用淚液試紙來測試淚液分泌的情況，測量淚液沾上試紙之長度來做為淚液量之分析。

- 淚液膜破裂時間 (TBUT)

將螢光染料滴入病人眼睛，並在裂隙燈或螢光顯微鏡下觀察淚液膜的情況。淚液膜破裂時間愈長，反映出淚液膜愈穩定，而能做淚液品質分析。

3. P1 purinergic receptors

腺苷受體是 G 蛋白偶聯受體(如下表)，在人類中，有四種類型的腺苷受體。A1 受體和 A2A 在心臟中起作用，調節心肌耗氧量和冠脈血流量；在腦中也有作用，調節其他神經傳遞物質如多巴胺和谷氨酸的釋放，而 A2A 受體具有抗發炎作用。A2B 和 A3 受體主要位於外圍，參與發炎與免疫反應。目前 P1 purinergic receptors 在淚腺中的表現已被證實(Edman *et al.*, 2008; Robin *et al.*, 2016)，且受到 ATP/ATP metabolites(例如 adenosine)誘發後會引起細胞內一連串的訊息傳遞，最後促進腺體分泌。

Receptor	Gene	Mechanism ^[17]	Effects	Agonists	Antagonists
A ₁	ADORA1 ¹⁶	G _{i/o} → sAMP ^[17] <ul style="list-style-type: none"> • Inhibition • ↓ vesicle release • Bronchoconstriction • Adherent arteriolar constriction in kidney 	<ul style="list-style-type: none"> • decreased heart rate 	<ul style="list-style-type: none"> • N6-Cydoxypentyladenosine • N6,2'-methoxy-5'-hydroxybenzyl adenosine riboside (B2) • Adenosine • CDPN • Certain Benzodiazepines and Barbiturates • 2-AminoCPA • GR 70206 • SDZ WAG 994 	<ul style="list-style-type: none"> • Caffeine • Theophylline • 8-Cyclopentyl-1,3,7-dimethylxanthine (CPX) • 8-Cyclopentyl-1,3,7-dipropylxanthine (DPCPX) • 8-Phenyl-1,3,7-dipropylxanthine • PSB 36
A _{2A}	ADORA2A ¹⁶	G _s → sAMP ^[17]	<ul style="list-style-type: none"> • coronary artery vasodilatation • Decreased dopaminergic activity in CNS • Inhibition of central neuron excitation 	<ul style="list-style-type: none"> • N6,3-methoxy-4'-hydroxybenzyl adenosine riboside (B2) • ATL-144e • CUS-21650 • Regadenoson • Adenosine 	<ul style="list-style-type: none"> • Caffeine • Theophylline • Intradermyline • SCH-58261 • SCH-442,416 • 2B-247,385
A _{2B}	ADORA2B ¹⁶	G _s → sAMP ^[17] Also recently discovered A _{2B} has G _i → DAG and IP ₃ → Release calcium → activate calmodulin → activate myosin light chain kinase → phosphorylate myosin light chain → myosin light chain plus actin → bronchoconstriction ^{[18] (not needed)}	<ul style="list-style-type: none"> • bronchospasm 	<ul style="list-style-type: none"> • S-N₆-ethylcarboxamidoadenosine • BAY 60-6833 • Adenosine • LUF-5835 • LUF-5845 	<ul style="list-style-type: none"> • Theophylline • Caffeine • CVT-6883 • BRIS-1766 • BRIS-1754 • PSB-603 • PSB-0788 • not sure

(https://en.wikipedia.org/wiki/Adenosine_receptor)

4. 咖啡因與腺苷受體之交互作用

咖啡因是中樞神經興奮劑。在沒有咖啡因的情況下，在 CNS 中存在少量腺苷。隨著長時間的清醒，腺苷 (adenosine) 會聚集在神經元突觸中，結合並活化腺苷受體，而導致疲憊困頓。當咖啡因被吸收時，咖啡因會阻斷腺苷與受體結合來防止活化受體，還能促進神經遞質的釋放 (例如乙酰膽鹼)，因此，咖啡能暫時減輕困倦。而咖啡因是所有四種腺苷受體 (A1, A2A, A2B 和 A3) 的拮抗劑。咖啡一旦進入大腦，主要的作用方式就是作為腺苷受體的拮抗劑。咖啡因分子在結構上與腺苷類似，並且能夠與細胞表面上的腺苷受體結合而不活化受體。咖啡因也可作為磷酸雙酯酶抑制劑。咖啡因能夠提高細胞內的 cAMP，活化蛋白激酶 A，抑制 TNF- α 和白三烯的合成，減少發炎。

參考資料:

Caffeine : <https://en.wikipedia.org/wiki/Caffeine>

5. 咖啡因影響淚液分泌的人體試驗

目前只有兩篇研究咖啡因對於淚液分泌是否有影響之論文，其中一篇以 41 名健康成人作為研究受試者，而其實驗做兩次，皆為雙盲測試。其結果指出攝食咖啡因後的 45 分鐘與 90 分鐘，受試者之淚液分泌量有顯著的升高；另一篇則以 78 名健康成人作為研究受試者，也指出攝入咖啡因後，淚液有顯著上升，而又與基因有關。兩項研究雖然都指出攝取咖啡因後會導致淚液分泌上升，但因為兩篇都是小型研究(受試者少)，又其研究並未指出咖啡因促進淚液分泌的確切機制，只有說明觀察到此現象，再加上於理論上，咖啡因的作用應該是與 adenosine 相反，也就是會抑制淚液分泌才對，可是先前的臨床試驗的結果指出反而是促進淚液分泌，種種因素下，使咖啡因是否能對淚液產生影響依然有很多研究者抱持懷疑態度。

(四)、 研究方法與步驟

1. 實驗器材：

36 隻 6 週大 ICR 雌性小白鼠、Pipette、Tips、不同濃度咖啡因溶液、螢光顯微鏡、淚液試紙、組織處理所需之各項器材、切片機、IHC 所需之各項器材、烘箱、西方墨點法所需之各項器材。

2. 實驗分組：

ICR 雌性小白鼠分為四組，每一組三隻，以不同時間做犧牲而分三批實驗，每批十二隻，合計三十六隻，分別為：

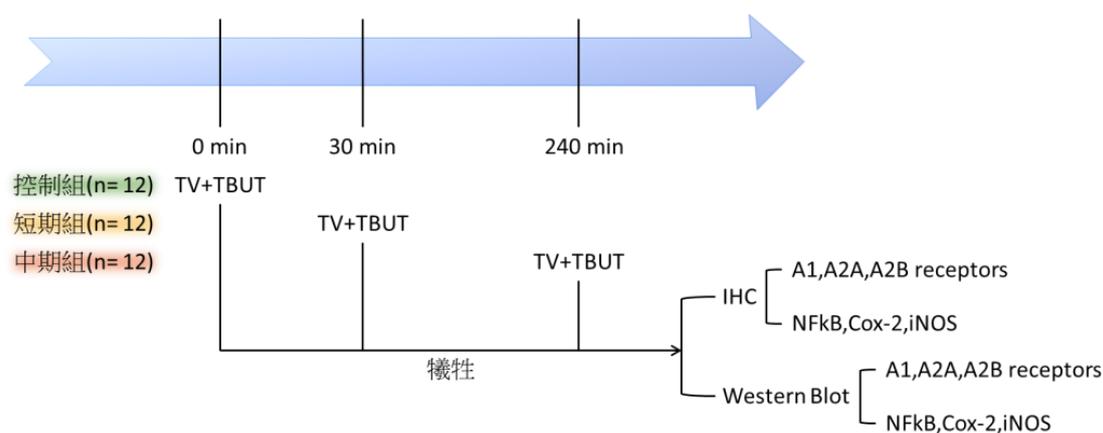
- (1) 控制組(Blank)：每天早上進行管餵 0.2 ml 0.9 % 食鹽水。
- (2) 低劑量組(low dose)：每天早上進行管餵 5 mg/kg 咖啡因與 0.2 ml 0.9 % 食鹽水混和溶液。
- (3) 中劑量組(medium dose)：每天早上進行管餵 15 mg/kg 咖啡因與 0.2 ml 0.9 % 食鹽水混和溶液。
- (4) 高劑量組(high dose)：每天早上進行管餵 30 mg/kg 咖啡因與 0.2 ml 0.9 % 食鹽水混和溶液。

實驗組(1) ~ (4)將餵食不同咖啡因濃度之溶液，並與控制組做比較，以確定最有效濃度。

3. 實驗步驟：

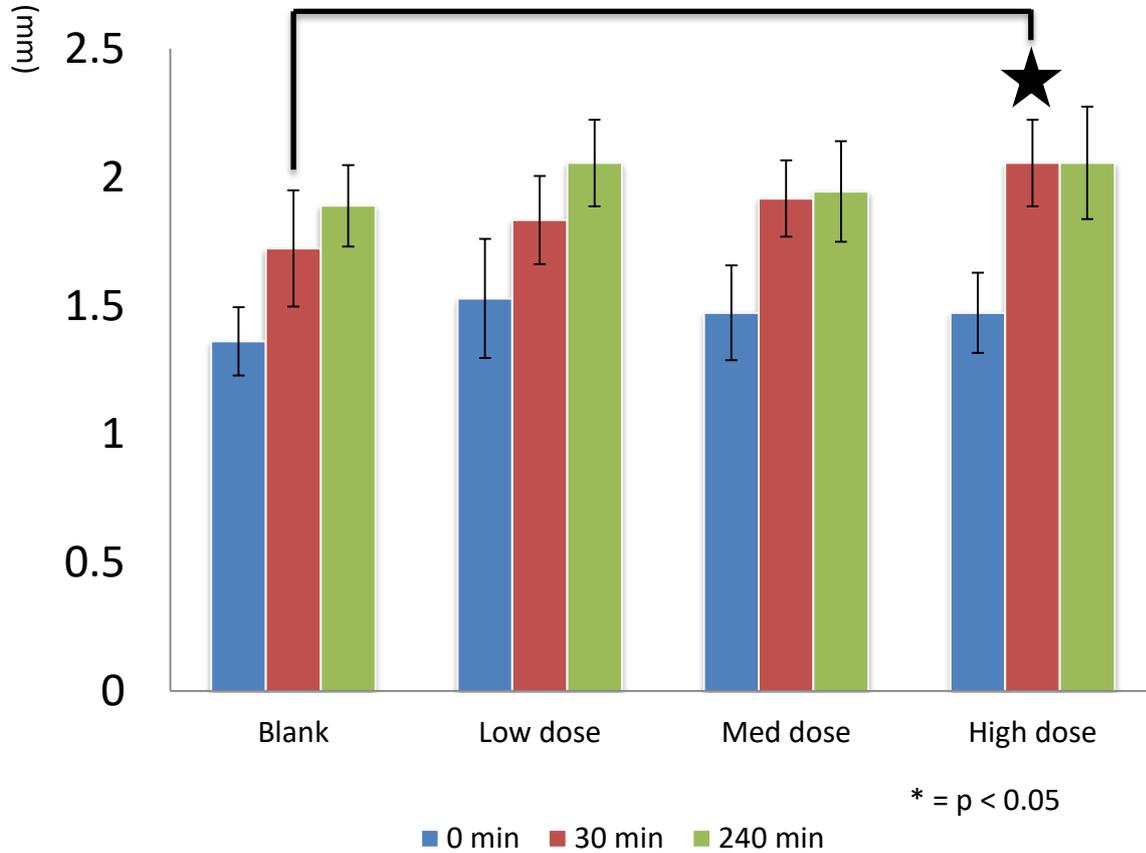
實驗分三批，一批四組，每一組三隻 ICR 雌姓小鼠，共三十六隻小鼠。第一批小鼠為空白控制組(0 min)，直接做淚液量測試(Tear Volume)(TV)與淚液膜破裂時間測試(Tear Break Up Time)(TBUT)。測試後即犧牲取下外淚腺，左右外淚腺分別包埋切片與進行西方墨點分析 NF-kB、Cox-2、iNOS，看是否有發炎的狀況產生，並且分析 P1 purinergic receptors (A1, A2A, and A2B)之表現狀態。第二批小鼠為短期組 (30 min)，於餵食 5、15、30 mg/kg 咖啡因 30 分鐘後做淚液量測試與淚液膜破裂時間測試並犧牲，左右外淚腺隨機分配包埋切片或進行西方墨點分析。第三批小鼠為中期組(240 min)，也是於餵食 5、15、30 mg/kg 咖啡因 240 分鐘後做淚液量測試與淚液膜破裂時間測試並犧牲，左右外淚腺分別包埋切片與進行西方墨點分析。

4. 實驗流程圖：



(五)、 研究結果

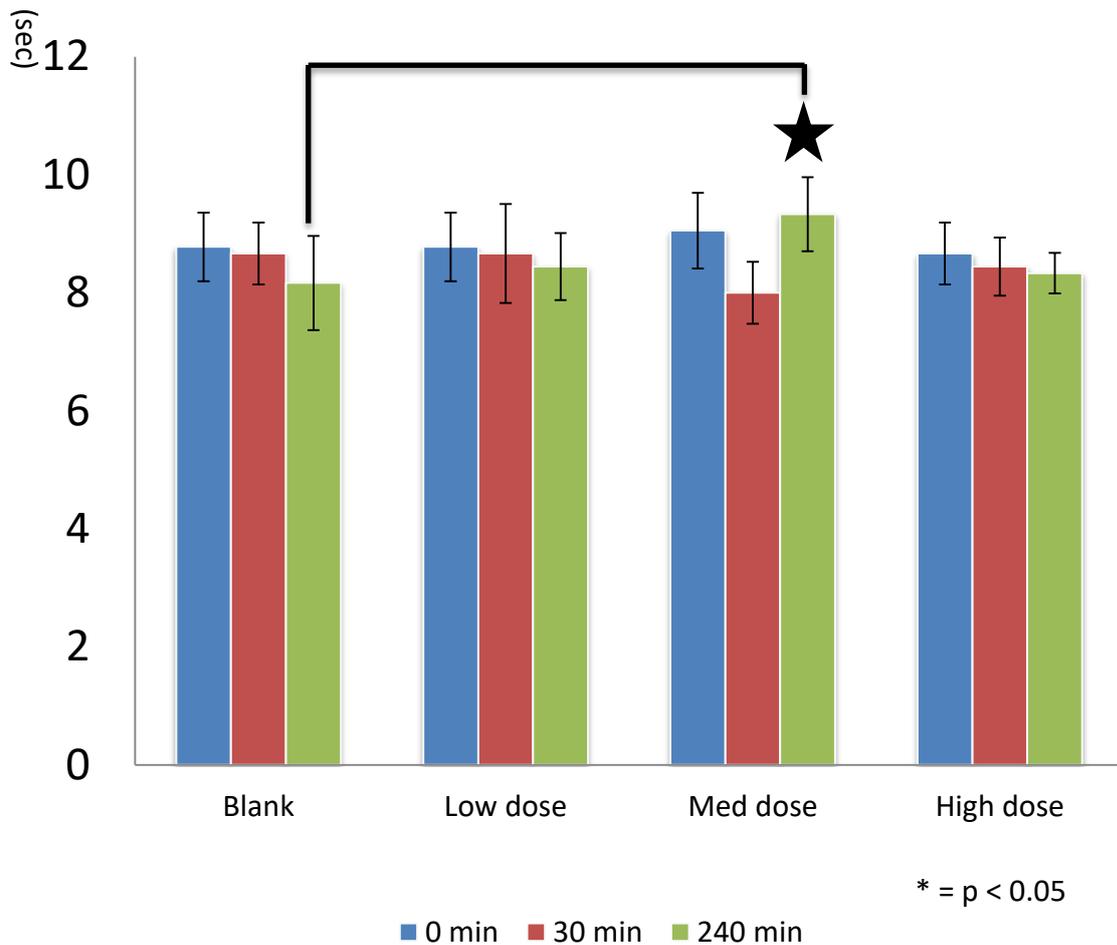
1. 淚液分泌量檢查 (TV)



▲圖 1. 淚液量分析，以各組之時間對控制組做比較。

利用淚液試紙來測試淚液分泌的情況，測量淚液沾上試紙之長度來做為淚液量之分析。圖 1. 中橫軸為四組分別在不同時間下測量，縱軸為測量出來淚液之平均長度(mm)，發現各實驗組之淚液分泌量與控制組並無太大差異。但餵食劑量 30 分鐘後與控制組比有些微淚液增加，並在餵食高劑量咖啡因 30 分鐘後，淚液分泌量顯著高於控制組($p < 0.05$)，故推論高劑量在 30 分鐘後會使淚液分泌增加，其餘時間點並未有太大差異。

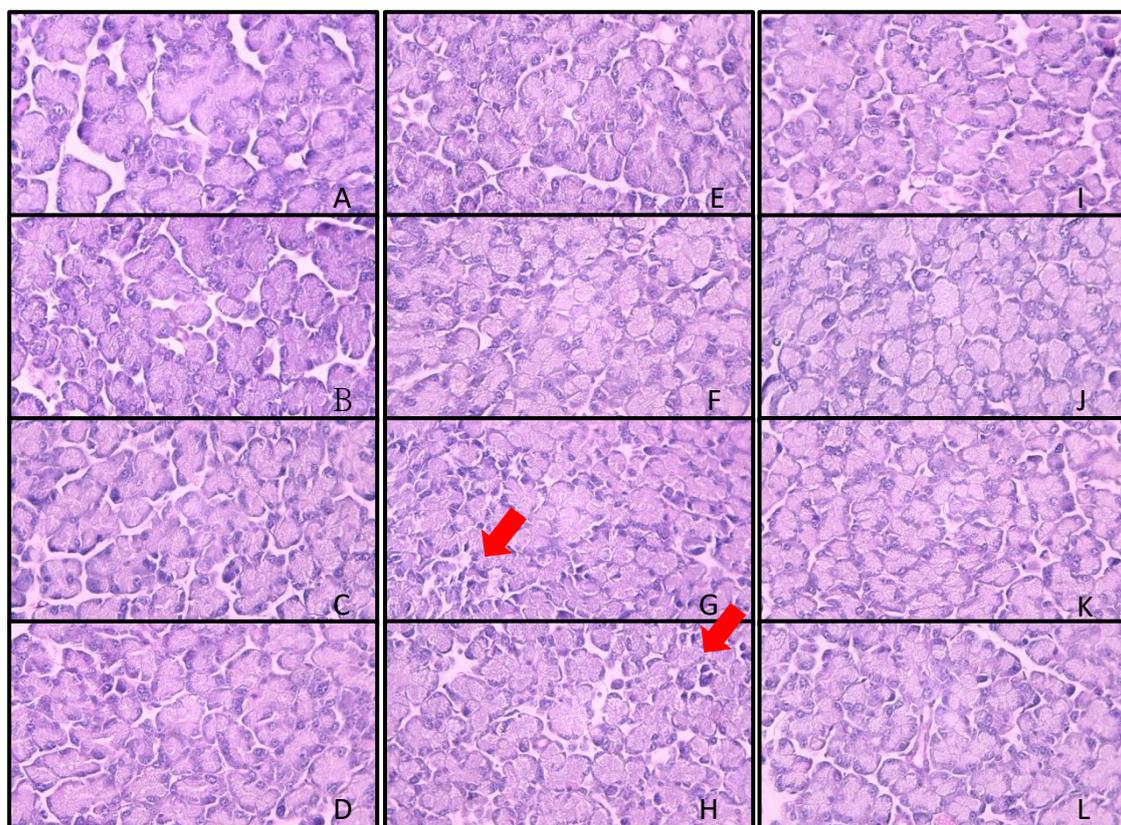
2. 淚液膜破裂時間 (TBUT)



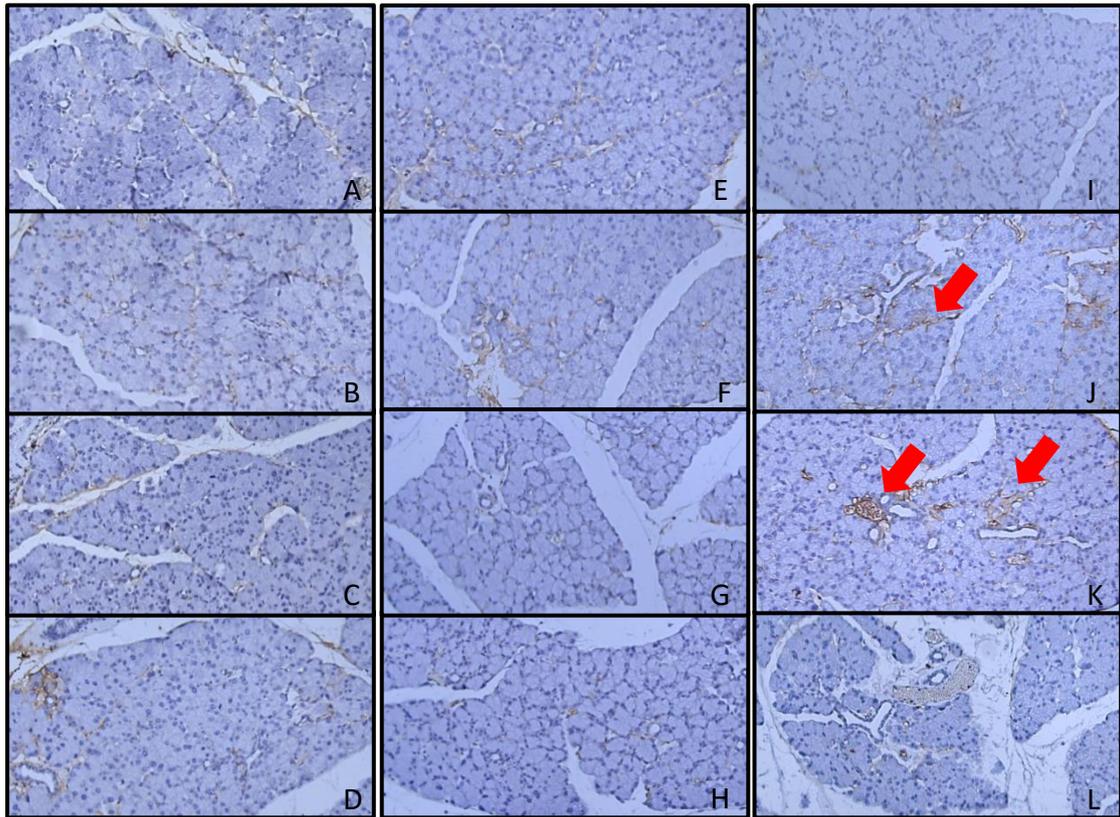
▲圖2. 淚液膜破裂時間，以各組之時間對控制組做比較。

將螢光染料滴入小鼠眼睛，並在螢光顯微鏡下觀察淚液膜的情況。淚液膜破裂時間愈長，反映出淚液膜愈穩定，而能做淚液品質分析。若淚液品質好，則淚液膜可維持一定的時間；若不好則時間減少。圖 2 中橫軸為四組分別在不同時間下測量，縱軸為測量出來淚液膜破裂時間之平均(sec)，發現各實驗組之淚液膜破裂時間與控制組並無太多差異。但在餵食中劑量咖啡因 240 分鐘後，淚液膜破裂時間顯著高於控制組($p < 0.05$)，故推論中劑量在 240 分鐘後會使淚液膜破裂時間增加，其餘時間點並未有太大差異。

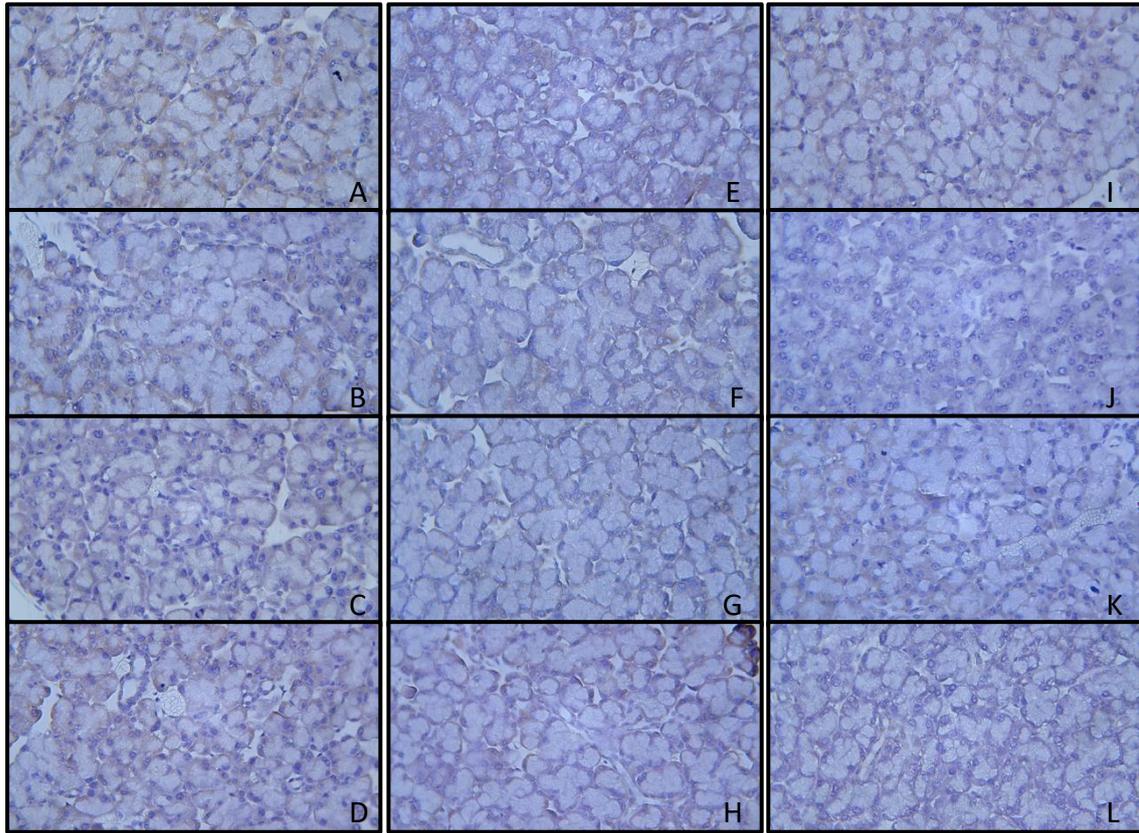
3. 外淚腺染色



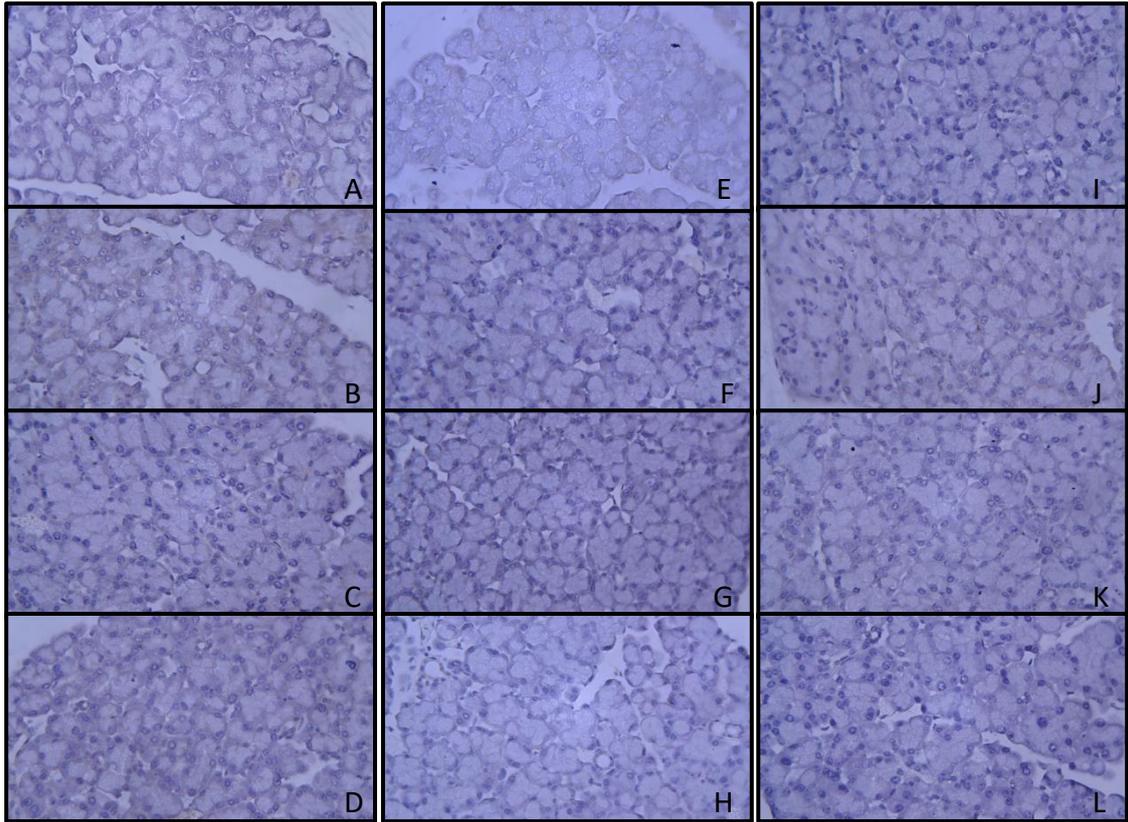
▲圖 3-1. 外淚腺 HE 染色法。A：Blank 0 min；B：Low dose 0 min；C：Med dose 0 min；D：High dose 0 min；E：Blank 30 min；F：Low dose 30 min；G：Med dose 30 min；H：High dose 30 min；I：Blank 240 min；J：Low dose 240 min；K：Med dose 240 min；L：High dose 240 min。(400X)大部分外淚腺細胞均為飽滿之細胞所組成，但在 30 分鐘時期，可以發現中與高劑量有部分細胞核聚集。



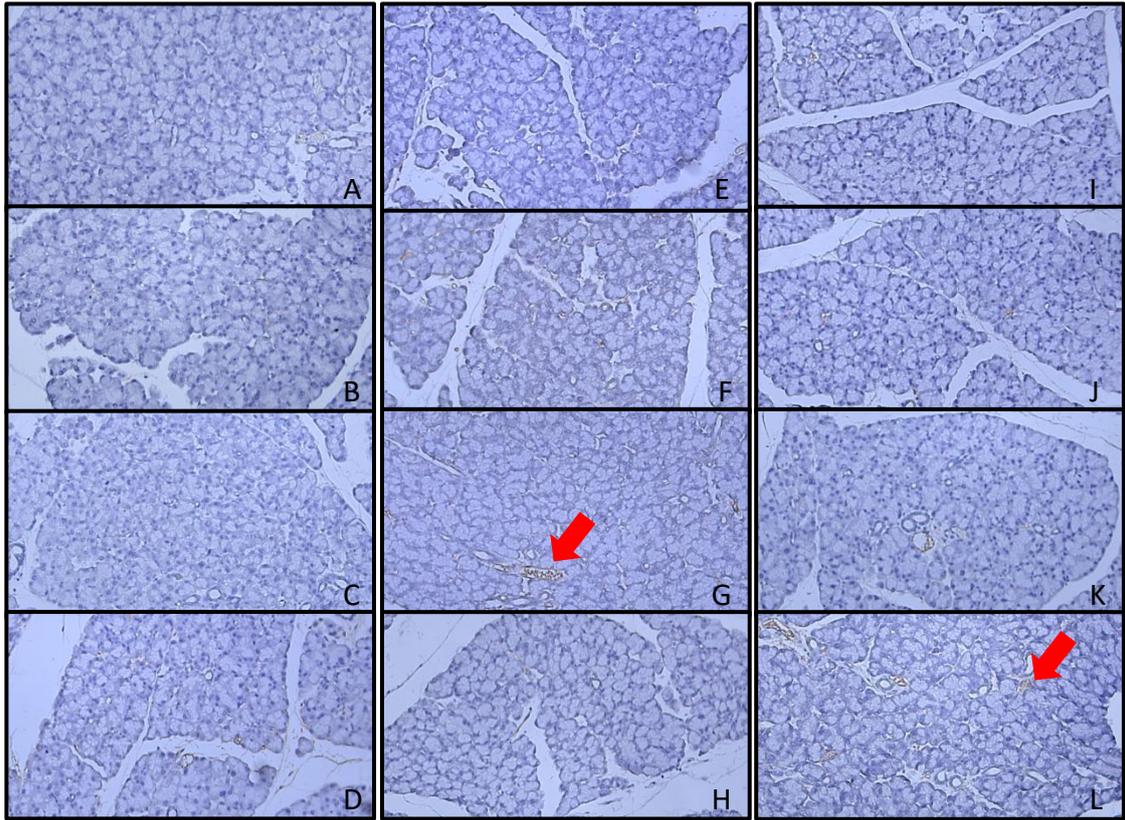
▲圖 3-2. 外淚腺 IHC 抗體染色法(adenosine A2a receptors)。A : Blank 0 min ; B : Low dose 0 min ; C : Med dose 0 min ; D : High dose 0 min ; E : Blank 30 min ; F : Low dose 30 min ; G : Med dose 30 min ; H : High dose 30 min ; I : Blank 240 min ; J : Low dose 240 min ; K : Med dose 240 min ; L : High dose 240 min 。(100X)在 0 分鐘與各時期的控制組中，可以發現有 adenosine A2a receptor 的訊號(棕色染色即為訊號所在)，而又以 240 分鐘時劑量組有較多的表現或與控制組相同表現，但在 30 分鐘時，高劑量卻有下降之趨勢。



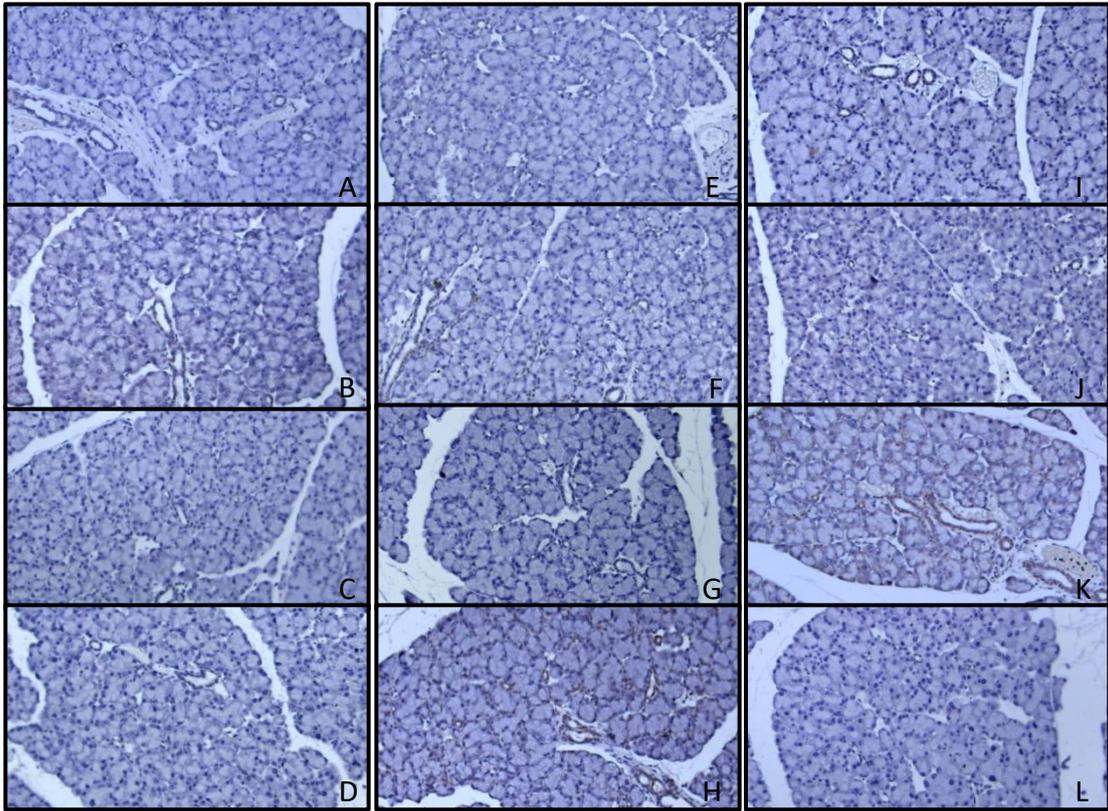
▲圖 3-3. 外淚腺 IHC 抗體染色法(adenosine A1 receptors)。A : Blank 0 min ; B : Low dose 0 min ; C : Med dose 0 min ; D : High dose 0 min ; E : Blank 30 min ; F : Low dose 30 min ; G : Med dose 30 min ; H : High dose 30 min ; I : Blank 240 min ; J : Low dose 240 min ; K : Med dose 240 min ; L : High dose 240 min 。(400X)各時期與各組均無明顯訊號增加與減少。



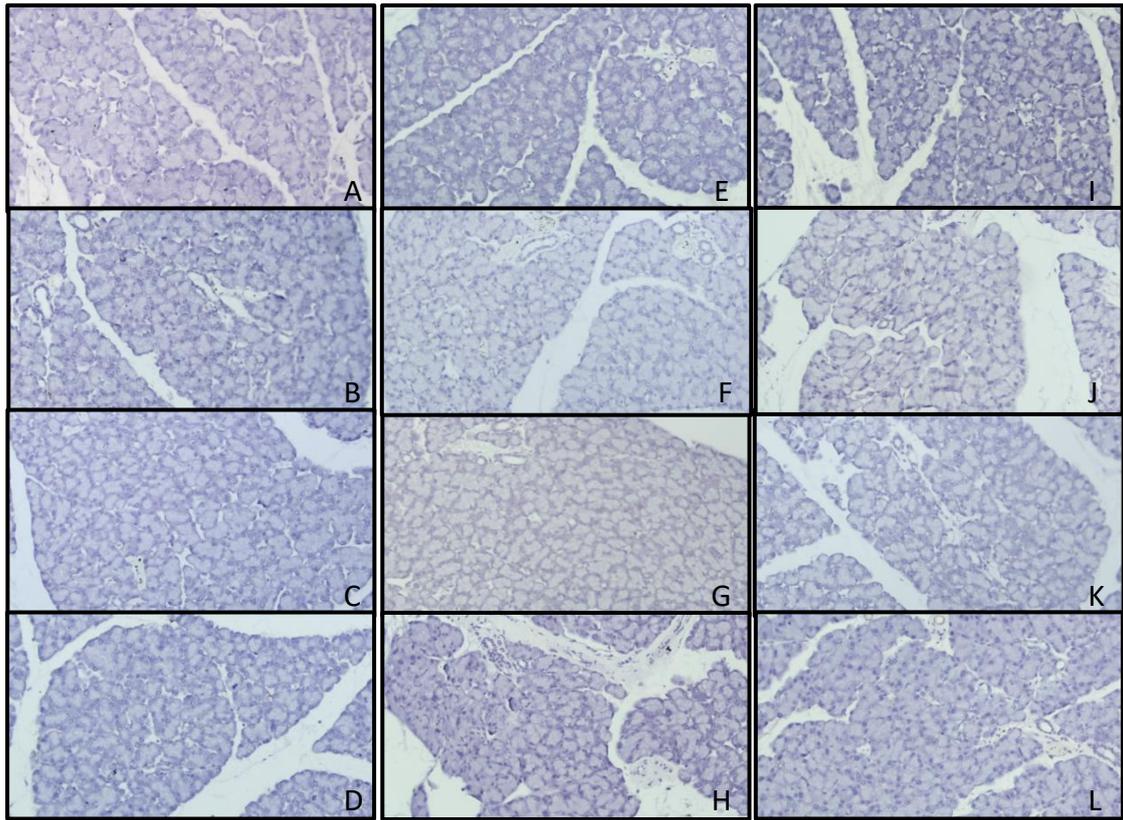
▲圖 3-4. 外淚腺 IHC 抗體染色法(adenosine A2b receptors)。A : Blank 0 min ; B : Low dose 0 min ; C : Med dose 0 min ; D : High dose 0 min ; E : Blank 30 min ; F : Low dose 30 min ; G : Med dose 30 min ; H : High dose 30 min ; I : Blank 240 min ; J : Low dose 240 min ; K : Med dose 240 min ; L : High dose 240 min 。 (400X) 各時期與各組均無明顯訊號增加與減少。



▲圖 3-5. 外淚腺 IHC 抗體染色法(iNOS)。A : Blank 0 min ; B : Low dose 0 min ; C : Med dose 0 min ; D : High dose 0 min ; E : Blank 30 min ; F : Low dose 30 min ; G : Med dose 30 min ; H : High dose 30 min ; I : Blank 240 min ; J : Low dose 240 min ; K : Med dose 240 min ; L : High dose 240 min。(100X)在 0 分鐘與各時期的控制組中，可以發現均沒有 iNOS 的訊號，但 30 分鐘的中劑量與 240 分鐘的中與高劑量組有表現。



▲圖 3-6. 外淚腺 IHC 抗體染色法(NFκB)。A : Blank 0 min ; B : Low dose 0 min ; C : Med dose 0 min ; D : High dose 0 min ; E : Blank 30 min ; F : Low dose 30 min ; G : Med dose 30 min ; H : High dose 30 min ; I : Blank 240 min ; J : Low dose 240 min ; K : Med dose 240 min ; L : High dose 240 min 。(100X)各時期與各組均無明顯訊號增加與減少。



▲圖 3-7. 外淚腺 IHC 抗體染色法(COX - 2)。A: Blank 0 min; B: Low dose 0 min; C: Med dose 0 min; D: High dose 0 min; E: Blank 30 min; F: Low dose 30 min; G: Med dose 30 min; H: High dose 30 min; I: Blank 240 min; J: Low dose 240 min; K: Med dose 240 min; L: High dose 240 min。(100X) 各時期與各組均無明顯訊號增加與減少。

染色結果統整圖(與控制組比較)

攝取劑量後時間	低劑量組			中劑量組			高劑量組		
	0 分鐘	30 分鐘	240 分鐘	0 分鐘	30 分鐘	240 分鐘	0 分鐘	30 分鐘	240 分鐘
淚液分泌量	無變化	增加	無變化	無變化	增加	無變化	無變化	顯著增加	無變化
淚液膜破裂時間	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	顯著增加
HE 染色	無變化	無變化	無變化	無變化	核聚集， 但無明顯 變化	無變化	無變化	核聚集， 但無明顯 變化	無變化
IHC-Adenosine A2a 染色	無變化	無變化	增加	無變化	無變化	增加	無變化	下降	無變化
IHC-Adenosine A2b 染色	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化
IHC-Adenosine A1 染色	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化
IHC-COX-2 染色	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化
IHC-NFkB 染色	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化	無變化
IHC-iNOS 染色	無變化	無變化	無變化	無變化	增加	無變化	無變化	增加	增加

4. Western blot 分析

Western blot 分析因檢體問體與操作人員技術問題，導致實驗結果一直失敗，而無此確認實驗結果。

(六)、 討論

本計畫提出以小鼠餵食咖啡因作為動物模式，要進行的研究及要回答的問題：

1. 建立咖啡因攝食誘發小鼠淚液分泌的研究模式，以回答攝食咖啡因是否會增加淚液分泌量？其劑量需要多少 mg/kg of body weight？

由圖 1. 可以發現攝食劑量後 30 分鐘，劑量組淚液分泌量較控制組稍高，並在高劑量組小鼠淚液分泌有明顯上升趨勢。高劑量組別所用之劑量為 30 mg/kg。

2. 攝食咖啡因是否會改善淚液品質？

由圖 2. 可以發現攝食劑量後 240 分鐘，中劑量組別淚液膜破裂時間顯著高於控制組，故可以推論攝食中劑量咖啡因後 240 分鐘能穩定淚液品質。

3. 攝食有效劑量的咖啡因，會對淚腺中的 P1 purinergic receptors (A1, A2a, and A2b) 表現量產生甚麼影響？

淚腺中的 P1 purinergic receptors 除了 adenosine A2a 有明顯差異，其他接受器均未有明顯變化。由圖 3-2 可以看到，adenosine A2a 在攝取劑量 30 分鐘後，高劑量組有下降之趨勢，而在 240 分鐘時劑量組又恢復或高於控制組的表現量，可以推論攝取高劑量之咖啡因 30 分鐘後能抑制接受器的表現量，而在攝取後 240 分鐘，即恢復。

4. 攝食有效劑量的咖啡因是否會導致淚腺發炎還是抑制發炎？短、中期效應是否有差別？

由 IHC 染色(COX-2 與 NFkB) 可以得知攝取咖啡因未明顯使淚腺有發炎現象，但在 IHC 的 iNOS 染色中，攝取劑量後 30 分鐘的中劑量組與 240 分鐘的中與高劑量組均有些微發炎表現。

本次實驗與假設結果不相吻合，可能原因有：

1. 假設立論之論文為使用人體試驗，而本次實驗是使用 ICR 母鼠，物種不同，變因不同(如性別等)，其作用機制也可能不同，而導致餵食咖啡因未有明顯淚液增加與品質變好之效果。
2. 假設立論之論文為使用成年人，而本次實驗是使用六周大之小鼠，小鼠之淚腺接受器可能尚未發育完全，導致無法因應咖啡因而有明顯劑量與作用時間之差異。
3. 假設立論之論文為使用人體有效劑量之咖啡因(OSEI, Kwaku Antwi, et al, 2014)，可能對於小鼠此劑量過多而導致實驗結果與人體試驗不相符合

(七)、 參考文獻

Arita RI, Yanagi Y, Honda N, Maeda S, Maeda K, Kuchiba A, Yamaguchi T, Yanagihara Y, Suzuki H, Amano S. Caffeine increases tear volume depending on polymorphisms within the adenosine A2a receptor gene and cytochrome P450 1A2. *Ophthalmology*. 2012. 119(5):972-8.

Cekic C and Linden Joe. Purinergic regulation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2016. 16, 177 - 192.

Edman MC, Andersson SV, Delbro D, Gierow JP. Functional expression of the adenosine A1 receptor in rabbit lacrimal gland. *Exp Eye Res*. 2008. 86(1):110-7.

Lin Pei-Yu, Tsai Su-Ying, Cheng Ching-Yu, Liu Jorn-Hon, Chou Pesus, Hsu Wen-Ming. Prevalence of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan: The Shihpai Eye Study. *Ophthalmology* 2003. 10(6): 1096-1101.

Osei KA, Ovenseri-Ogbomo G, Kyei S, Ntodie M. The effect of caffeine on tear secretion. *Optom Vis Sci*. 2014. 91(2):171-7.

Ribeiro JA, Sebastião AM. Caffeine and adenosine. *J Alzheimers Dis*. 2010. 20 Suppl 1:S3-15.

Robin R. Hodges and Darlene A. Dartt. Signaling pathways of purinergic receptors and their interactions with cholinergic and adrenergic pathways in the lacrimal gland. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2016. 32(8): 490 - 497.

Sanderson J, Dartt DA, Trinkaus-Randall V, Pintor J, Civan MM, Delamere NA, Fletcher EL, Salt TE, Grosche A, Mitchell CH. Purines in the eye: recent evidence for the physiological and pathological role of purines in the RPE, retinal neurons, astrocytes, Müller cells, lens, trabecular meshwork, cornea and lacrimal gland. *Exp Eye Res*. 2014. 127:270-9.

Sasaki T, Gallacher DV. The ATP-induced inward current in mouse lacrimal acinar cells is potentiated by isoprenaline and GTP. *J Physiol*. 1992. 447:103-18.

Yen Ju-Chuan, Hsu Chia-An, Li Yu-Chuan (Jack), and Hsu Min-Huei. The prevalence of dry eye syndrome' s and the likelihood to develop Sjögren' s syndrome in Taiwan: a population-based study. *Int J Environ Res Public Health*. 2015. 12(7): 7647 - 7655.