

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計畫名稱： 蟬花萃取物對於預防紫外線造成角膜傷害與淚液品質影響之分析 \*  
\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 林立云  
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-006-B  
研究期間： 104年07月01日至105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 105年03月16日

# 目錄

目錄	I
中文摘要	III
Abstract	IV
一、文獻探討	1
1-1 紫外線	1
1-2 角膜	3
1-3 淚液生理調節機制與乾眼症	4
1-4 角膜損傷動物模組	5
1-5 蟬花	6
二、研究動機與待釐清的問題	7
三、實驗材料與方法	8
3-1 實驗流程	8
3-2 實驗材料	8
3-3 實驗分組	9
3-4 實驗方法	9

四、結果討論	-----	15
4-1 淚液品質	-----	15
4-2 角膜狀態	-----	20
4-3 角膜表面	-----	21
4-4 角膜結構與免疫分析	-----	24
4-5 未來發展	-----	27
五、參考文獻	-----	28

## 中文摘要

日常生活中我們的雙眼不時會接受紫外線的照射，長時間受到過量的紫外線照射會造成角膜受損發炎，出現紅、熱、痛、癢等症狀，亦會導致乾眼症的症狀如淚液量下降、淚液品質低落等問題，嚴重的話可能導致白內障。在本研究中，我們使用紫外線 B(強度  $0.72\text{J}/\text{cm}^2$ ) 照射導致眼睛受損的模組，實驗完整週期為十天，前面三天給與餵食蟬花萃取物並於第四到十天每天實施紫外線 B 照射，來驗證其是否能預防與改善受損狀況。使用 32 隻 6-8 週大的 ICR 母鼠，分成四個組別，空白對照組與紫外線傷害組餵食 0.9% 生理食鹽水，兩個餵食組，餵食濃度分別為 10ppm 與 100ppm 溶於 0.9% 生理食鹽水的中草藥萃取物，在照射週期中做淚液測試觀察淚液狀況的變化。於第十天測驗後拍攝眼表照片分析其角膜狀況，並犧牲取下眼球組織進行後續分析處理。實驗結果發現：攝取高濃度蟬花萃取物組整體狀況與控制組最為接近，於 100ppm 組可看出眼表狀況有改善，淚液量也有顯著提升。後續分析淚液品質、角膜結構與用免疫化學染色觀察發炎因子的變化時，發現具可抑制發炎反應、維持淚液品質與角膜結構，對於改善紫外線造成的傷後有預防及改善的功效。

關鍵字：紫外線 B、角膜、淚液品質、乾眼症、發炎因子

## Abstract

Excessive exposure to ultraviolet B (UVB) irradiation causes corneal surface damages and inflammatory responses, leading to a status of photokeratitis. In this study, we evaluated the efficacy of *Cordyceps sobolifera* extracts against UVB-induced photokeratitis and investigated the underlying mechanisms.

A total of 32 female ICR mice were divided into (1) blank group, (2) UVB-damaged plus 0.9 % NaCl vehicle control group, (3) UVB-damaged plus *Cordyceps sobolifera* extracts group at 10 mg/Kg, and (4) UVB-damaged plus *Cordyceps sobolifera* extracts group at 100 mg/Kg. The mice were given daily *Cordyceps sobolifera* extracts for 3 days, and then exposed to UVB at 0.72 J per square centimeter followed by another 7 days of dietary *Cordyceps sobolifera* extracts intake. The vehicle controls were exposed to UVB, but only given 0.9 % NaCl of the same volume. Tear production was then assessed at days 3, 7, and 10. At day 10, the mice were evaluated for ocular surface damages, including smoothness, opacity, topography, and lissamine green staining. Functional assessments including tear film breakup time (TBUT), corneal sensitivity (CS) were also performed. After the evaluations, the mice were sacrificed and processed for pathological and immunohistochemical analyses.

The results showed that *Cordyceps sobolifera* extracts were effective for alleviation of corneal damages induced by UVB irradiation, as indicated by less damages on corneal smoothness, opacity, and topography as well as less detainment of lissamine green staining. Besides, the eyes from mice with *Cordyceps sobolifera* extracts showed longer TBUT and better CS. Immunohistochemical analysis revealed less pro-inflammatory factors in the corneas and tear with *Cordyceps sobolifera* extracts given after UVB exposure, as compared to those without treatments.

We conclude that *Cordyceps sobolifera* extracts could potentially be used for prevention against UVB-induced cornea damages and maintain the quality of the tear.

**Key words :** ultraviolet B 、 cornea 、 quality of tear 、 dry eye symptom 、 inflammatory factors

# 一、文獻探討

## 1-1 紫外線

紫外線(Ultraviolet ray)是種來自太陽輻射的電磁波之一，波長比可見光短，但比 X 射線波長長，肉眼無法看見，大部分地球表面上的紫外線來自太陽，少部分來自如水銀燈，日曬燈和黑光燈等。雖然大氣層會吸收大部分輻射線，但仍有部分輻射線會穿越大氣層對人體造成某些程度的傷害。

紫外線依照波長的不同可分為：

### (1) 紫外線 A (320~400nm):

陽光中的紫外線穿過大氣層到達地表，約有 95%~98%是紫外線 A，由於其波長最長所以具有很高的穿透能力，可以穿透大部分透明的玻璃以及塑膠，在眼睛組織的部分，紫外線 A 容易造成眼底視網膜及水晶體的慢性傷害，加速視網膜、玻璃體及水晶體的老化及退化。

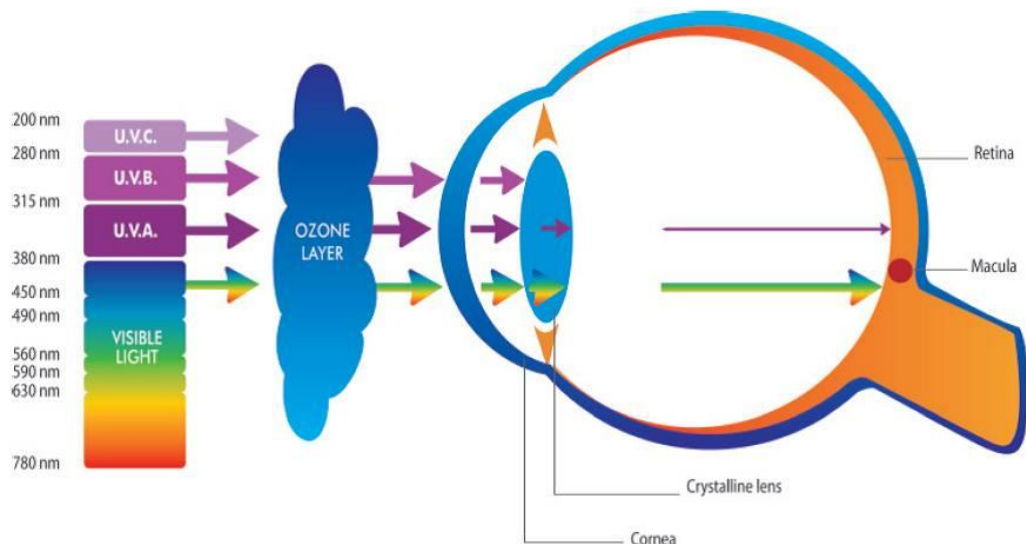
### (2) 紫外線 B (280~320nm):

紫外線 B 的穿透力較子外線 A 還要低，陽光中所含有的紫外線 B 大部分會被臭氧層所吸收，只有約 2%能到達地球表面。在眼球部分主要是被眼角膜所吸收，也會造成結膜的結締組織增生，眼瞼皮膚因為曝曬造成角質增生，使眼角膜結膜及眼瞼

組織傷害即加速老化

(3) 紫外線 C (100~280nm):

波長較短，所蘊含的能量最強，也因此對人體造成的傷害是最大的，會被眼球表面的眼角膜吸收，造成眼角膜發炎或受傷，但是幾乎所有的紫外線 C 都會被臭氧層所隔離，到達地表的量遠不如 UVB 多。

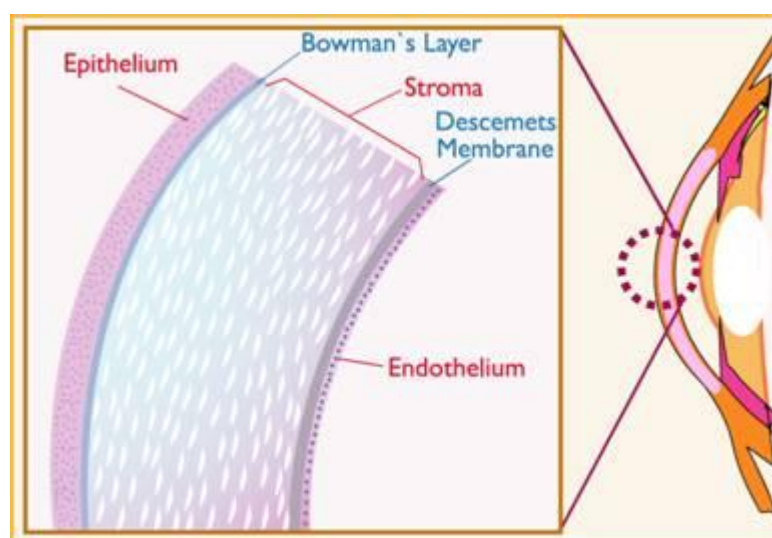


圖片來源: <http://www.eyes-and-sun.com/en/all-about-protection/the-risks-for-your-eyes/>

各波長對人體的傷害各有不同，其中中波長(280 奈米至 320 奈米)的 UVB 會被保護眼睛的角膜吸收，若暴露於過量的紫外線會導致角膜上皮層、淋巴幹細胞區等受損，使角膜無法完善修復，進而導致角膜發炎，白內障等疾病。

## 1-2 角膜

角膜是眼睛最前面的透明組織，覆蓋虹膜、瞳孔及前房，具有透明無血管與感覺神經豐富的特點，表面有一層淚液膜保護。角膜為眼睛提供大部分屈光力。加上水晶體的屈光力，光線便可準確地聚焦在視網膜上構成影像，亦會吸收有害光線保護眼球。就區域來說，角膜由中心向外可分為三區：中央角膜區，周圍角膜區，淋巴幹細胞區；其中淋巴幹細胞具有修補角膜受損及分化能力；而結構上角膜由外向內分成五層：上皮細胞層、前彈力層(包曼氏膜)、基質層、後彈力層(德氏膜)與內皮細胞層。其中淋巴幹細胞區的淋巴幹細胞會修補角膜上皮細胞層，由周圍角膜修復到中央角膜，若淋巴幹細胞區受損或傷害過於嚴重，可能導致無法妥善修復，造成角膜受損並影響其細胞的分化能力。



圖片來源：<http://www.hybridcornea.org/aboutcornea.htm>

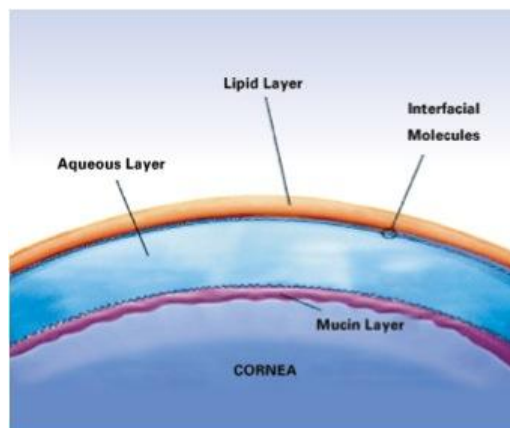


## 1-3 淚液生理調節機制

### 1-3-1 淚液

正常的眼睛表面有一層淚液層(Tear film)，由淚腺產生，攜帶有纖維素、營養素及抗菌物質，經由眨眼的動作而均勻分布，覆蓋在眼角膜及結膜上，形成一個潤滑保護膜，最後經由鼻淚管排除掉。

淚液層雖薄只是覆蓋在眼睛表面的一層薄膜，但它對於眼睛表面來說可是相當重要的存在，淚液層具有許多的功能，包括：(1)提供眼球平滑的光學表面，(2)供給眼球角膜上皮細胞氧氣，(3)潤滑角膜及眼瞼內面，(4)防止眼球表面的乾燥，(5)幫助眼睛表面異物雜質的排除。暴露於過量的紫外線下，對於分泌淚液中黏蛋白的杯狀細胞亦有損害，暴露於過量紫外線會導致杯狀細胞凋亡，進而黏蛋白分泌量下降，而淚液分成三層：水層、黏蛋白層、脂層，任何亦曾有所損害都足以影響淚液品質，淚液品質下降與角膜上皮層受損後，會出現乾眼症的症狀。



圖片來源：<http://dryeyes.com.au/the-tear-film-is-critical/>

### 1-3-2 乾眼症

乾眼症為一種常見的眼睛疾病，其造成的原因有藥水影響、暴露於紫外線中、持續風吹等，影響全球約百分之十五到三十五的人口；患者反映其眼睛有乾燥、泛紅、燒灼與異物感；乾眼症會造成角膜受損，損傷角膜細胞的分化能力，進而影響視力。故暴露於過量紫外線中，會對角膜與淚液帶來極大的損害。要有健康的角膜，良好的淚液品質、結構功能完善的角膜上皮細胞層與淋巴幹細胞區是密不可分的。

### 1-4 角膜損傷動物模式

動物模式(animal model)是指在某種動物身上經自發或人為誘導產生疾病或特定之生命現象，若與發生於人類者相似，則可應用該種動物為「模式」，做為瞭解人類發生該疾病或該特定生命現象之機制。藉由動物試驗，我們得以探討生理、藥理、免疫、生化及其他生物相關領域的知識，近由瞭解疾病發生的原因，找出治療的方法，現今許多的動物試驗依然是為了類似的原因，期望能夠使人或其他動物的生活品質過更好，以增進更多人或動物的福祉。

在現實生活中並不可能使用人體來進行活體實驗，因此藉由實驗動物模式做為替代，以人為的方式誘導出角膜的傷害模式、做為研究的範本。

## 1-5 蟬花

蟬花（學名：*Cordyceps sobolifera*），又名胡蟬、蟬菌、蟬蛹草、金蟬花、蠶茸，是麥角菌科蟲草屬真菌，會寄生在蟬蛹或者是山蟬的幼蟲身上，使其死亡，然後將其屍體變成菌核，並在屍體前段長出子座，是一種菌蟲複合體。主要出現在中國的四川、江蘇、浙江、福建，曬乾後可入藥。蟬花為名貴傳統中藥材，據《本草綱目》記載有散風熱、鎮驚、明目之功效。



圖片來源：<https://sbnhomebeautyblog.wordpress.com/2011/09/27/cordycepsciecadaeshing/>

## 二、研究動機與待釐清的問題

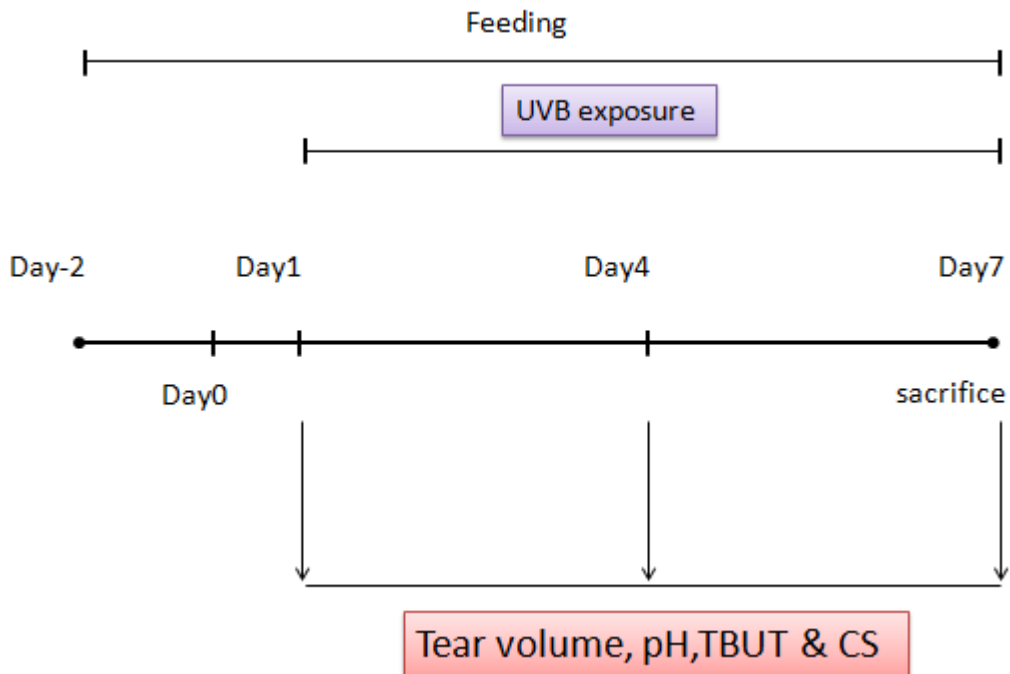
生理上來說，角膜會吸收波長280到320奈米的紫外線B來保護眼球，然而暴露於紫外線B導致角膜受損，誘發出乾眼症的症狀，嚴重時甚至會導致白內障。而隨著環境汙染的日益增加，臭氧層的破壞愈來愈嚴重，導致紫外線接觸到地表的量大幅提升，過度暴露於紫外線照射亦導致了杯狀細胞的凋亡，黏蛋白的分泌量降低進而使淚液品質下降、損傷角膜細胞的分化能力，導致角膜扁平上皮細胞的死亡，影響角膜整體功能。

淚液覆蓋角膜之上扮演著保護角膜及維持及濕潤度的角色。曝照於紫外線下會促使結膜內的杯狀細胞的死亡，導致杯狀細胞分泌的黏蛋白量減少，造成淚液品質降低，出現乾眼症的症狀，影響角膜健康狀態。

目前市面上已出現許多預防紫外線傷害的工具，如太陽眼鏡，抗紫外線隱形眼鏡等，大多都是外帶配件，保健食品等預防傷害之產品不多見。而據《本草綱目》記載，蟬花有散風熱、鎮驚、明目之功效。故猜測攝取其萃取物有可能可以抑制角膜發炎反應，減緩角膜發炎所造成的傷害，維持角膜的健康，改善其淚液品質等效果，可能可以改善甚至預防紫外線對角膜所帶來的傷害，希望藉由實驗來找出其可能的預防或是修復機制。

### 三、實驗材料與方法

#### 3-1 實驗流程



#### 3-2 實驗材料

##### (1) 實驗動物:

從樂斯科公司購買品系 ICR 的母鼠，年齡在 7~10 週，體重 25~33g，飼養在中山醫學大學實驗動物中心，提供正常的飼料及飲水，生活環境為 12 小時照光及 12 小時黑暗的循環光照，溫度控制在  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，濕度控制在  $50\pm 5\%$ 。

##### (2) 紫外線燈

選擇從 Vilber Lourmant 購買的紫外線燈，燈管型號為 VL-6MC，波常設定為 280nm~320nm 範圍，主要波峰在 312nm。

### 3-3 實驗分組

實驗的分組為:(1)空白對照組,不照射紫外線也不給予任何萃取物;(2)紫外線照射傷害組:每天給予紫外線B強度 $0.72\text{J cm}^2$ 的照射,帶不給予任何萃取物;(3)蟬花萃取物實驗組,每天給予紫外線B強度 $0.72\text{J cm}^2$ 的照射,並分別餵食10、100ppm的蟬花萃取物。

### 3-4 實驗方法

#### (1)餵食及紫外線照射

每天以經口頭藥的方式讓小鼠攝取各種不同濃度的蟬花萃取物,於實驗的第一天,也就是開始照射紫外線B的前三天開始進行投藥,並從第四天開始,在餵食完對小鼠施打麻醉劑2.5% Avertin (2,2,2-Tribromethanol, Sigma, T48402; 2-Methylbutanol-2; Sigma, 24, 048-6),確認已經麻醉不會動之後將小鼠放置在暗箱中,單邊眼睛朝上並給予 $0.72\text{ J/cm}^2$ 強度的紫外線B照射60秒,結束之後將小鼠翻面照射另外一眼,實驗持續進行七天,並於最後一天進行角膜外觀分析,結束之後犧牲取出眼球組織。

#### (2)淚液測試

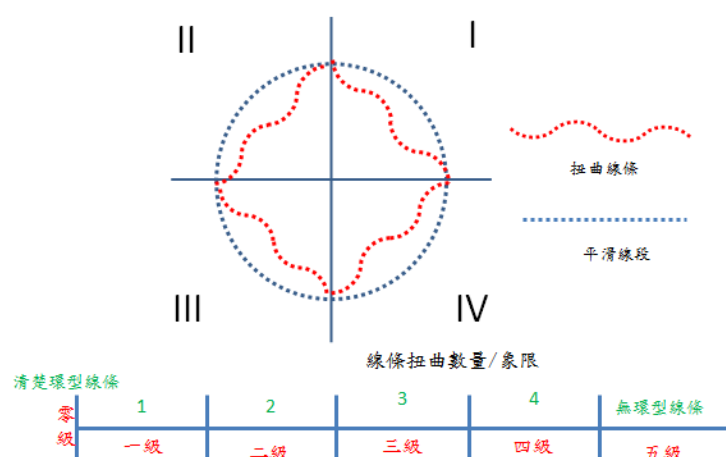
於實驗的第四天、第七天及第十天測試小鼠之淚液分泌量,使用

石蕊試紙(Toyo Roshi Kaisha, Lto)做為測試的工具，將石蕊試紙裁切成每一條寬 1mm 的細紙條，將小鼠麻醉後微微將眼皮撐開，將石蕊式指插入靠近耳側的眼窩處，於 20 秒後將石蕊試紙取出測量長度，藉此測量小鼠的淚液分泌量。

### (3) 角膜外觀分析

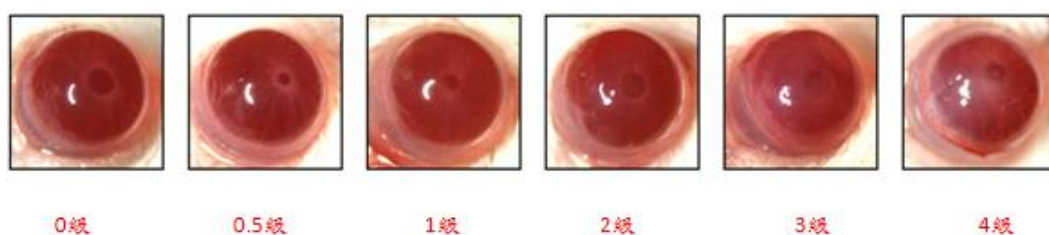
#### a. 角膜平滑度分析(corneal smoothness test):

以環形光源照射角膜，並以角膜反射環行光源影像的完整度做分級，將分析結果分為 0-5 級: 第零級為完整無扭曲的環形影像；第一級為約四分之一環形出現扭曲；第二級為約二分之一環行出現扭曲；第三級為約四分之三環形出現扭曲；第四級為整個環形皆出現扭曲；若是環形線條極度扭曲以至無法辨別出環形線條定義為五級。



b. 角膜清澈度分析(corneal opacity test):

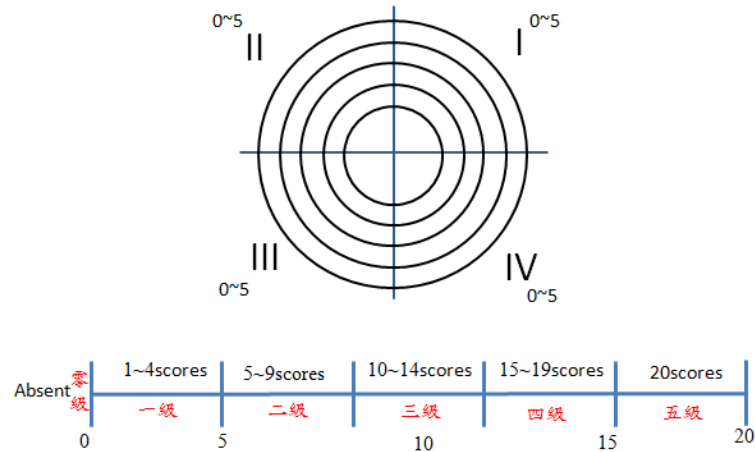
以光源照射眼睛，藉由角膜的不透明程度做為評斷的標準，分析結果分為 0-4 級: 第零級為正常的角膜，無不透明現象；第零點五級為輕微的不透明現象，只能透過解剖顯微鏡才能觀察到；第一級為輕度不透明變性；第二級為中度不透明變性，但還可以觀察到紅膜；第三級為中度不透明變性，但無法觀察到紅膜；第四極為重度不透明變性，角膜呈現嚴重白色混濁狀，並且伴隨著角膜潰瘍。



c. 角膜地圖分析(corneal topography test):

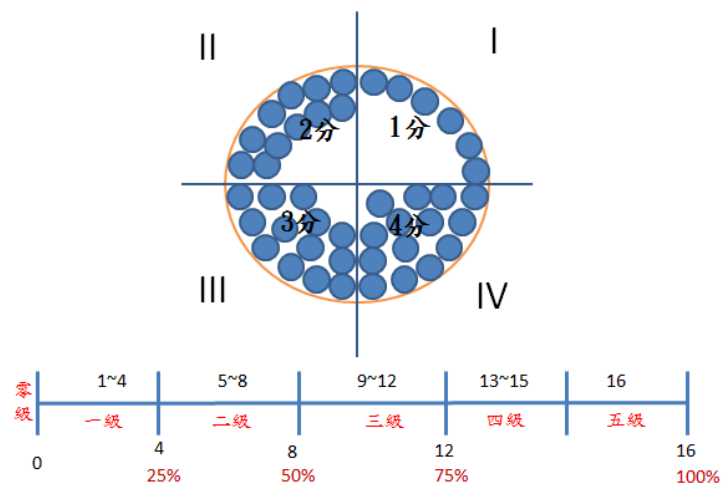
角膜地圖以等高線的方式反映出較大範圍之角膜表面的平滑程度，分析結果分為 0-5 級: 第零級為完整無扭曲的環形線條；第一級為約四分之一環形線條出現扭曲；第二級為約二分之一環形線條出現扭曲；第三級為約四分之三環形線條出現扭曲；第四級為所有環形皆出現扭曲；當所有線條皆扭曲至無法辨認出環形結構則定義為第五級。





d. 角膜損傷染色分析(corneal staining test):

若是角膜受到傷害，則會染上染劑，藉由染劑染色程度評估角膜受傷的程度。分析結果分為 0-5 級: 第零級為無任何染色，第一級為角膜染色程度在 25% 以下，第二級為染色程度在 25~50%，第三級為染色程度在 50%~75%，第四級為染色程度在 75% 以上，若是整個角膜皆染上顏色則定義為第五級。



(4) Hematoxylin & Eosin staining (HE staining)

麻醉後的小鼠以頸椎脫臼法犧牲，在上眼瞼的尾端綁上線做為定

位的標記，取出的眼球組織放置在 3%福馬林(87ml 50% Ethanol ; 8ml 37% Formaldehyde, Sigma, F1635; 5ml Glacial acetic acid)中 24 小時，接著依序放置在 40%、75%、85%、95%，及 100% 1-Butanol(Wako, 026-03326)中進行脫水，接著放置於石蠟盆中靜置到隔天進行石蠟包埋。

進行組織切片，厚度為 5um，於 50°C 的水中展片並將組織貼附在 Silance coating 的玻片(Micro Slides, 5116)上，放置在室溫下讓水氣揮發後進行 HE stain。將玻片依序放進 100%二甲苯、100%乙醇、95%乙醇、75%乙醇、50%乙醇、25%乙醇，以及二次水中脫蠟復水後，以蘇木紫(Hematoxylin, Dako, S330930)染色 90 秒鐘，以一次水清洗乾淨後加入酸性酒精(acid alcohol)10 秒鐘，以一次水清洗乾淨後以伊紅(Eosin, E6003)染色 15 秒鐘，再以一次水清洗乾淨後放乾封片。

#### (5)免疫組織化學染色(Immunohistochemistry staining, IHC)

將玻片依序放進 100%二甲苯、100%乙醇、95%乙醇、75%乙醇、50%乙醇、25%乙醇，以及二次水中脫蠟復水，放入 citrate buffer 中以中火-中火-中弱的循環強度微波數次，直到組織呈現半透明狀態，

靜置到 citrate buffer 變涼後再倒掉一次水洗淨，加入 5% $H_2O_2$  反應 5 分鐘，清洗乾淨後加入 1% blocking buffer 反應 5 分鐘，在中間的等待時間準備一抗(COX-2)，跟具抗體的稀釋倍數取需要的量以 blocking buffer 稀釋，將玻片取出加入一抗並蓋上玻片，在 4°C 的環境下放置隔夜。將蓋玻片甩掉後放置在 TBS(tris-buffered saline) 中清洗 10 分鐘，加入 super engancer 並蓋上蓋玻片避免液體蒸發，反應半小時後將蓋玻片甩掉並以 TBS 清洗，加入 poly-HRP 並蓋上蓋玻片反應一個半小時以 DAB 進行呈色，呈色完的玻片放入二次水中靜置，再用蘇木紫染色 90 秒，以一次水清洗乾淨後加入酸性酒精 10 秒鐘，以一次水清洗乾淨，等玻片乾燥後封片。

#### (6)統計分析

使用 Excel 中的 TTEST 功能來統計分析。統計值 \* $p < 0.05$ ，  
\*\* $p < 0.001$ ，\*\*\* $p < 0.0001$ 。

#### 四、結果討論

本研究使用紫外線 B(強度  $0.72\text{J}/\text{cm}^2$ )照射導致眼睛受損的模組，實驗完整週期為十天，前面三天給與餵食蟬花萃取物並於第四到十天每天實施紫外線 B 照射，來驗證其是否能預防與改善受損狀況。

使用 32 隻 6-8 週大的 ICR 母鼠，分成四個組別，空白對照組與紫外線傷害組餵食 0.9%生理食鹽水，兩個餵食組，餵食濃度分別為 10ppm 與 100ppm 溶於 0.9%生理食鹽水的中草藥萃取物，在照射週期中做淚液測試觀察淚液狀況的變化。於第十天測驗後拍攝眼表照片分析其角膜狀況，並犧牲取下眼球組織進行後續分析處理。

以下為實驗數據結果與討論，分為淚液品質、角膜狀態、角膜表面、角膜結構與免疫分析與未來發展五大部分，所有實驗數據分析，使用 Excel 中的 TTEST 功能來進行統計分析。統計值 $*p<0.05$ ， $**p<0.001$ ， $***p<0.0001$ ，各組 n 值=8。

##### 4-1 淚液品質

正常的眼睛表面有一層淚液層，由淚腺產生，攜帶有纖維素、營養素及抗菌物質，經由眨眼的動作而均勻分布，覆蓋在眼角膜及結膜上，形成一個潤滑保護膜，而淚液品質我們可以從淚液量、淚液的酸鹼值變化與淚液膜破裂時間來分析討論。

#### 4-1-1 淚液量

暴露於紫外線照射下會導致淚液品質下降與淚液量減少，出現乾眼症的症狀。(統計值 $*p<0.05$ ， $**p<0.001$ ， $***p<0.0001$ ，各組 n 值 =8。)

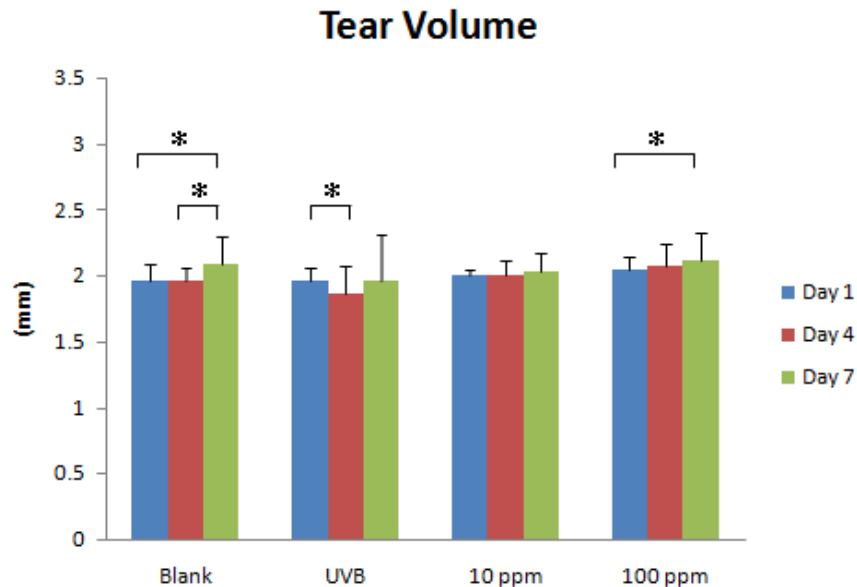


Fig.1 不同組別的淚液量統計長條圖

在不同組別的淚液量統計長條圖(Fig.1)，可以見到除了紫外線照射組淚液量下降之外，其他組別的淚液量維持平穩，其中攝取高濃度蟬花萃取物組淚液量有顯著上升。在淚液變化折線圖(Fig.2)中，我們可以清楚的看到其變化，而其中紫外線照射組在最後一天測量時的淚液量偏高，可能原因是因為紫外線傷害後造成的發炎反應，導致淚液大量分泌，但是其淚液品質差，所以仍有乾眼症的症狀。

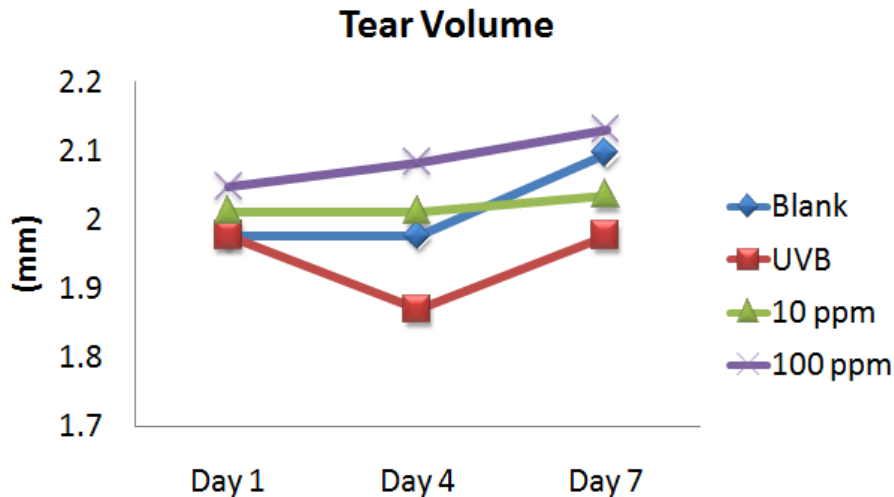


Fig.2 淚液量變化折線

就淚液量方面，攝取蟬花萃取物的組別相較於傷害組，其淚液量有所提升，又以高濃度蟬花萃取物攝取組表現最優，可以推測其有改善紫外線引道的乾眼症之淚液量下降的症狀。

#### 4-1-2 淚液的酸鹼值變化

在實驗過程用試紙測量淚液量時發現，不同的組別其淚液的 pH 值會有所不同，推測其可能跟淚液品質有關，已知受損後淚液成分有所改變，故測試淚液 pH 值來檢驗紫外線帶來的傷害，除了影響淚液品質外是否會影響其 pH 值。

數據經由統計後繪製出淚液 pH 值變化統計長條圖(Fig.3)與淚液 pH 值變化折線圖(Fig.4)，從圖表與數據中可以發現攝取高濃度蟬花萃取物的組別 pH 值非常穩定，故推測若淚液 pH 質較為穩定，淚腺與角膜可能較為健康且淚液品質較佳。(統計值 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ，

\*\*\*p<0.0001，各組 n 值=8。)

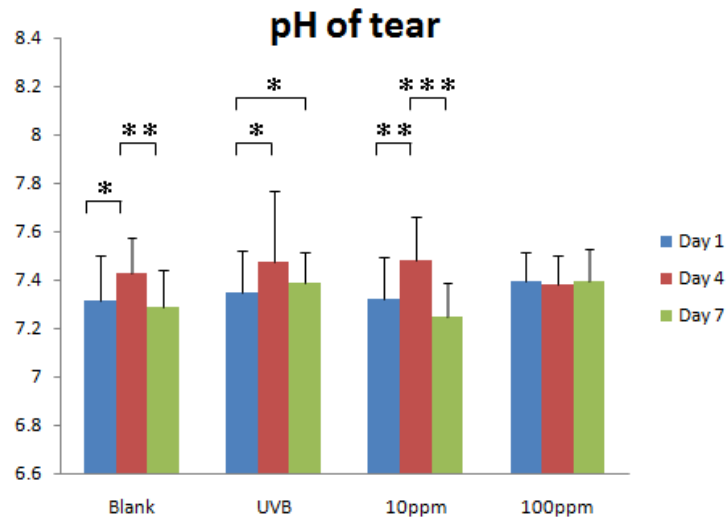


Fig.3 pH 值變化統計長條圖

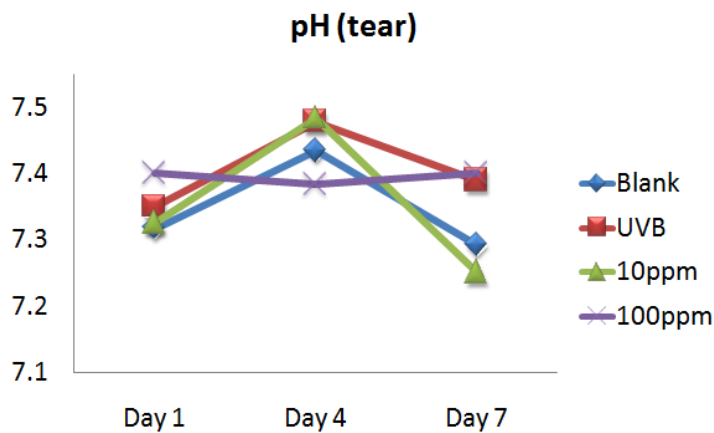


Fig.4 淚液 pH 值變化折線圖

#### 4-1-3 淚液膜破裂時間

淚液膜破裂時間(Tear film Break-up Time)測試來斷其淚液品質狀況，若淚液品質較優，則淚液膜可維持較久才破裂，實驗中採用螢光染料染淚液膜，使用螢光顯微鏡的藍光進行觀察拍攝實驗過程，判讀

實驗過程的影片來計算其淚液膜可維持多久，藉此評斷淚液品質。

(統計值 $*p<0.05$ ， $**p<0.001$ ， $***p<0.0001$ ，各組 n 值=8。)

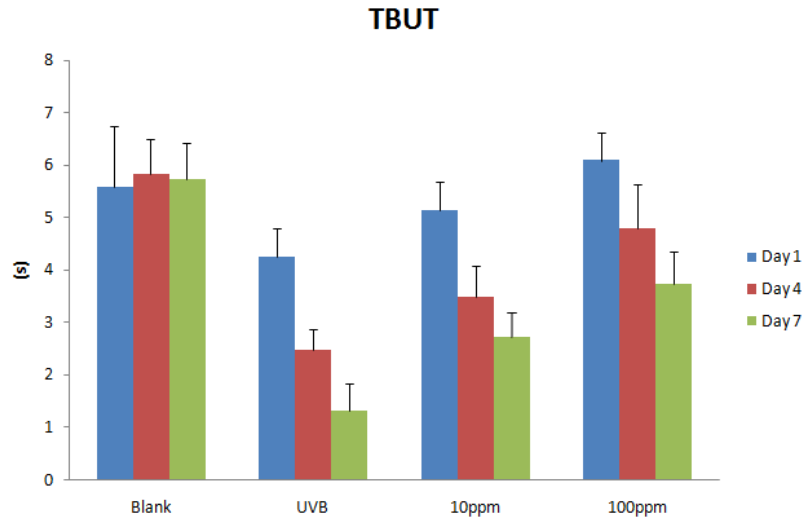


Fig. 5 不同組別淚液膜破裂時間統計長條圖

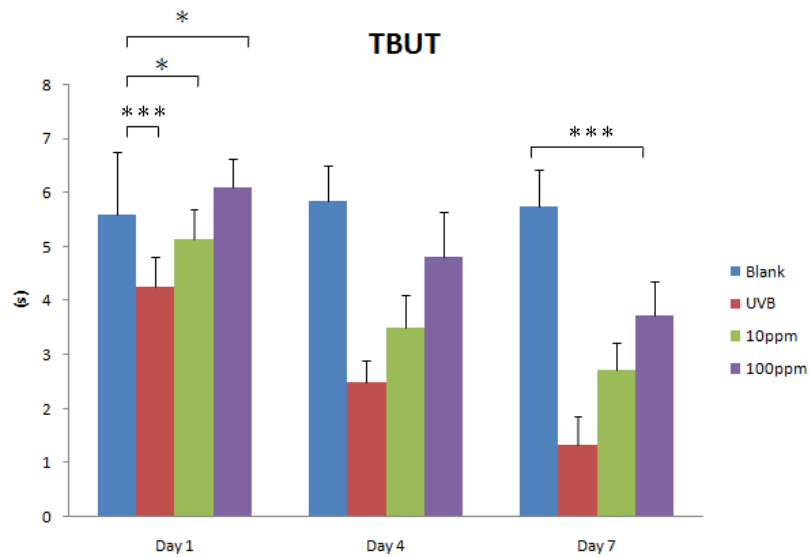


Fig. 6 不同天數淚液膜破裂時間比較長條圖

統計結果做成兩張圖表，不同組別淚液膜破裂時間統計長條圖

(Fig. 5)與不同天數淚液膜破裂時間比較長條圖(Fig. 6)，可以發現相

較於自外線照射組，攝取高濃度蟬花萃取物的組別在照射紫外線之後

仍然能維持較長的淚液膜破裂時間，低濃度攝取組次之，由此數據可



以推測高濃度蟬花萃取物具有維護淚液品質之功效。

由淚液量、淚液的酸鹼值變化與淚液膜破裂時間我們可以發現，高濃度的蟬花萃取物能維持淚液量並維護淚液品質。

#### 4-2 角膜狀態

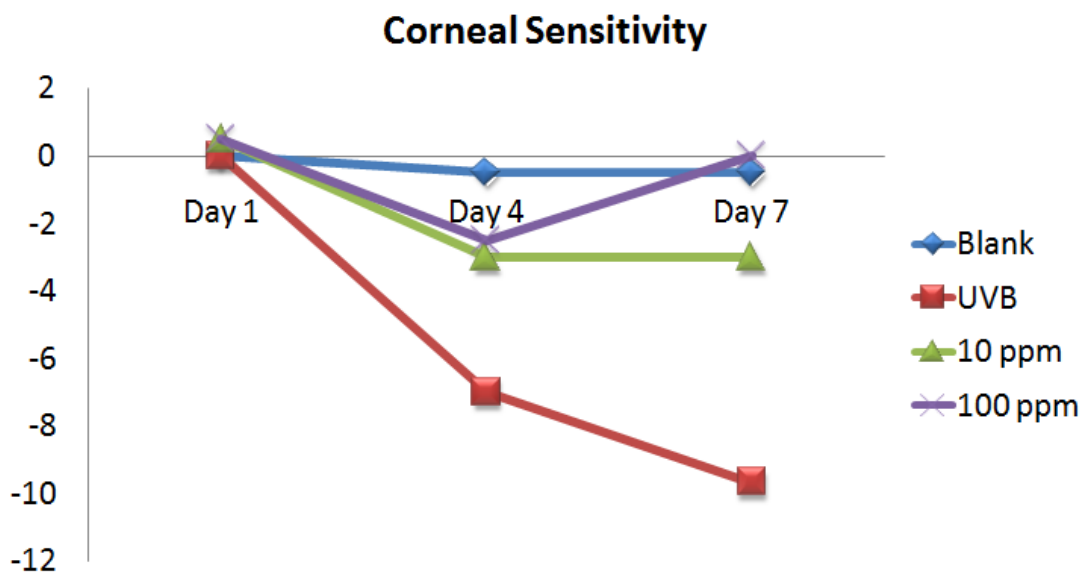


Fig. 7 角膜敏感度變化折線圖

角膜暴露於紫外線照射下受損後分布在角膜上的神經會萎縮壞死，用特製工具輕觸角膜，若不需施力而小鼠有了眨眼反映代表其角膜敏感度高，若需施加力道才有反應則反之，測驗角膜敏感度來判斷角膜受損情。(統計值 $*p<0.05$ ， $**p<0.001$ ， $***p<0.0001$ ，各組 n 值=8。)

用正常對照組的數據最為基準值，來看相較於此組，其他組的敏感度變化，由角膜敏感度變化折線圖(Fig. 7)可見，紫外線照射組的敏感度大幅度降低，而攝取低濃度蟬花萃取物的組別敏感度下降不多，

攝取高濃度的組別甚至在第七天敏感度的比正常對照組高，可以推測其能保護甚至減少角膜上神經在紫外線照射後的萎縮壞死。

#### 4-3 角膜表面

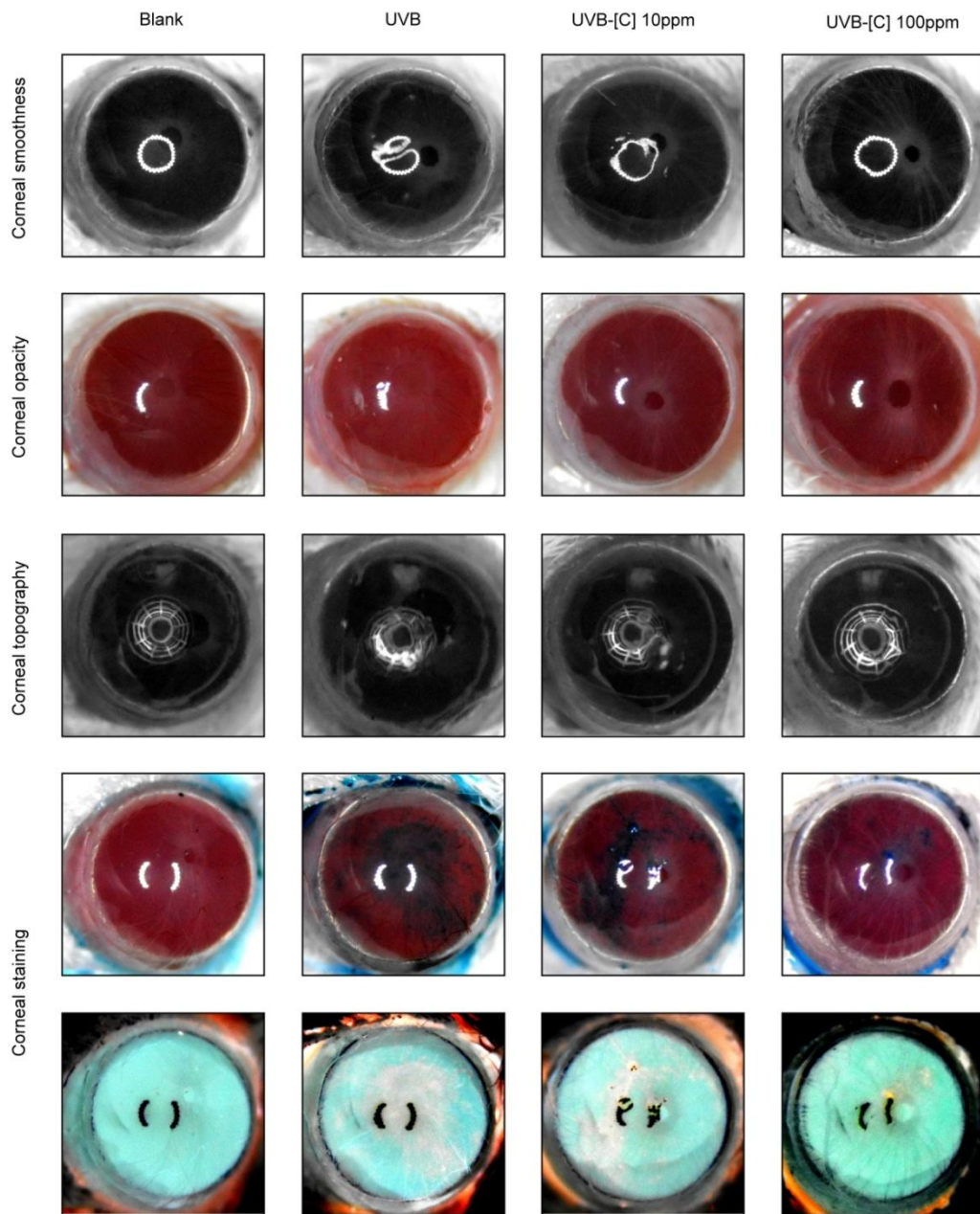


Fig. 8 角膜表面照片圖表

角膜表面照片圖表(Fig. 8)中，可看出在平滑度方面，攝取高濃度蟬花萃取物的組別其平滑度狀況較接近正常對照組，圓形光圈較為完整，清澈度方面，相較於傷害組之不透明，攝取蟬花萃取物的組別有不同程度的改善，其中以高濃度組為最優，就由角膜地圖儀，我們可以發現其角膜不同象限之扭曲程度以傷害組為最，攝取不同濃度的蟬花萃取物，已高濃度組的改善狀況為優，低濃度組次之，角膜染色方面可看出角膜何處受損，並透過負片處理後的照片可更清楚的發掘其傷害著重於周圍角膜(Peripheral Cornea)上，攝取高濃度蟬花萃取物組仍有較佳的表現。

將角膜表面照片量化統計統計，得到以下圖表：(統計值 $*p<0.05$ ， $**p<0.001$ ， $***p<0.0001$ ，各組 n 值=8。)

### (1)角膜平滑度

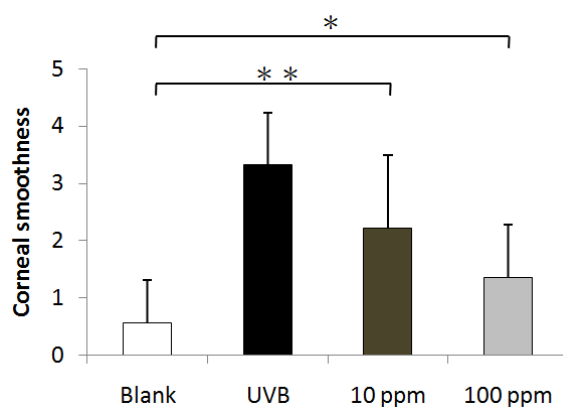


Fig. 9 角膜平滑度統計長條圖

從角膜平滑度統計長條圖(Fig. 9)中，我們可以發現，紫外線照射組傷害等級最高，平滑度最低，攝取蟬花萃取物的組別則

有所改善，高濃度組優於低濃度組。

### (2) 角膜清澈度

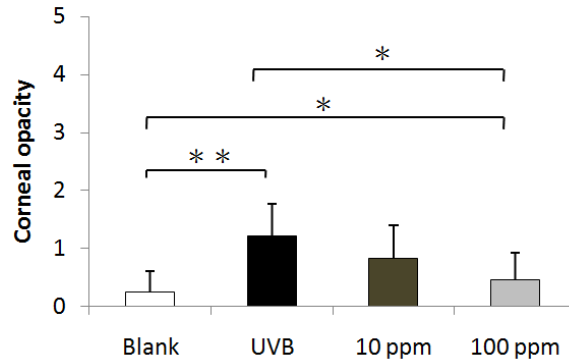


Fig. 10 角膜清澈度統計長條圖

從角膜清澈度統計長條圖(Fig.10)中，我們可以發現，紫外線照射組傷害等級最高，清澈度最低，攝取蟬花萃取物的組別則有所改善，高濃度組優於低濃度組。

### (3) 角膜地圖儀

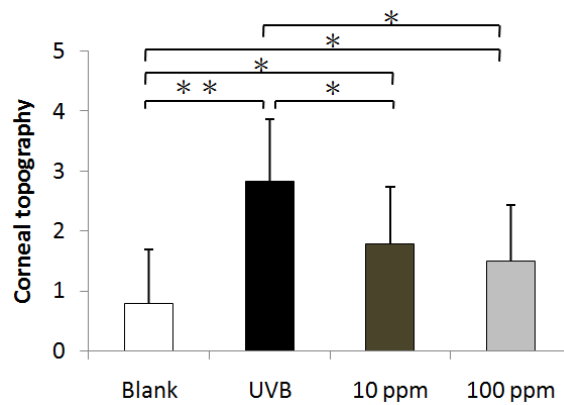


Fig. 11 角膜地圖儀統計長條圖

從角膜地圖儀統計長條圖(Fig.11)，我們可以發現其角膜不同象限之扭曲程度以紫外線傷害組為最，攝取不同濃度的蟬花萃取物，以高濃度組的改善狀況為優，低濃度組次之。

#### (4) 角膜染色分析

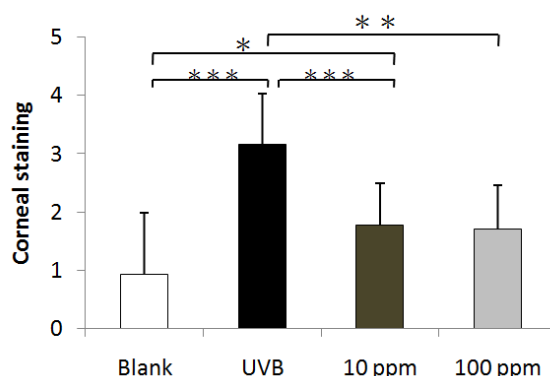


Fig. 12 角膜染色分析統計長條圖

從角膜染色分析長條圖(Fig.12)，我們可以發現其角膜染劑殘留以紫外線照射組數據最高，意味著傷害最重，攝取不蟬花萃取物後有所改善，高濃度與低濃度蟬花萃取物改善程度不相上下。

由以上關於角膜表面之圖表分析，我們可以發現攝取高濃度的蟬花萃取物組在角膜表面的狀況表現優異，其趨勢與淚液品質還有角膜狀態相符。

#### 4-4 角膜結構與免疫分析

角膜由中心向外可分為三區：中央角膜區，周圍角膜區，淋巴幹細胞區；其中淋巴幹細胞具有修補角膜受損及分化能力。動物犧牲後眼球組織包埋切片，並進行一系列染色，用來探討其角膜結構狀態與免疫分析。(各組 n 值=8。)

#### 4-4-1 角膜結構(H. E Stain)

由蘇木紫與伊紅染色，可以清楚觀察並分析其角膜結構，藉由角膜結構綜合比較圖(Fig. 13)，將正常控制組與紫外線照射組作為對照，可以明顯看到，正常控制組有六至七層角膜上皮細胞，且細胞型態正常，而照射紫外線的組別只有一到兩層角膜上皮細胞，且細胞變形、空泡化，攝取不同濃度的蟬花萃取物有不同程度的改善，其中以高濃度蟬花萃取物其角膜結構狀態較接近正常控制組，從照片中亦可觀察到其紫外線造成的角膜上皮細胞傷害在周邊角膜較為嚴重，與角膜表面照片分析結果相符，而具有修復效果的淋巴幹細胞區，在紫外線照射後明顯細胞減少且腫脹空泡化，代表修復能力下降，照片中可見攝取蟬花萃取物組具有保護角膜被紫外線破化之功效，在淋巴幹細胞區亦有效果，代表其仍具有修復角膜之功能。

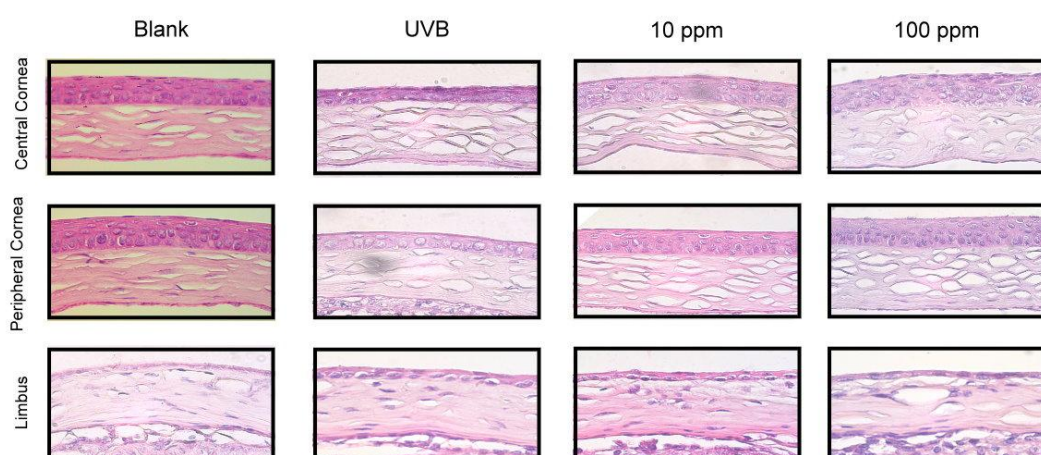


Fig. 13 角膜結構綜合比較圖



#### 4-4-2 免疫分析染色(抗體 COX-2)

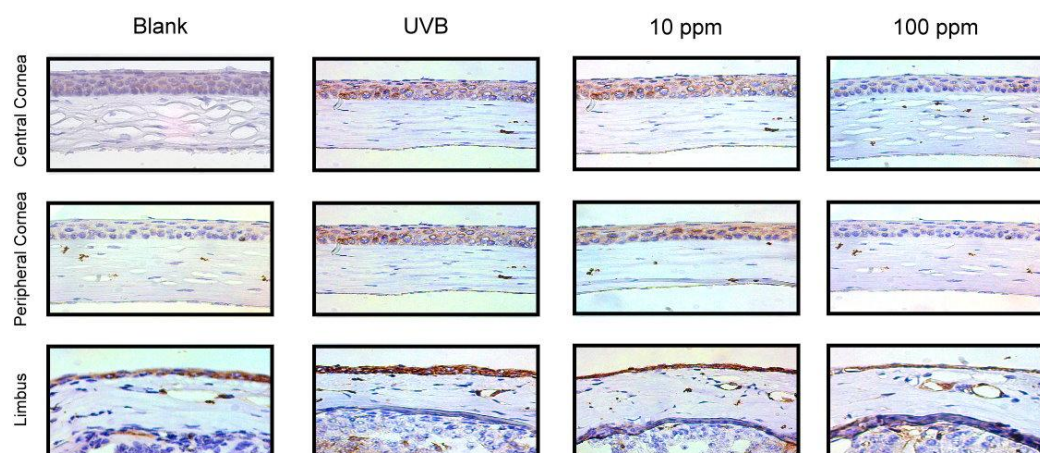


Fig. 14 角膜免疫分析綜合比較圖

藉由免疫組織染色分析發炎因子 COX-2 的表現情形，若是組織受到傷害，會發生發炎的現象，發炎因子表現量上升，而正常未受傷的組織不會有發炎因子表現，故可以就由發炎因子的表現來探討組織是受到傷害與蟬花萃取物是否有預防傷害減緩發炎反應的功效。

從角膜免疫分析綜合比較圖(Fig. 14)中我們可以看到，相較於正常控制組，紫外線照射組具有大量發炎因子訊號表現，而蟬花萃取物攝取組也有發炎因子的表現，但是攝取的蟬花萃取物濃度越高，其發炎因子的表現量下降，代表組織受到保護與發炎症狀減緩，在照片中亦可看出，組織受損結構不全的紫外線照射組發炎因子表現量最高，而結構趨於完整的高濃度蟬花萃取物組發炎因子表現量低，與正常控制組不相上下，可以推測蟬花萃取物具有保角角膜結構免於受到自可以推測蟬花萃取物具有保角角膜結構免於受到紫外線照射傷害與減

緩罰炎症狀之功效。

從淚液品質、角膜狀態、角膜表面、角膜結構與免疫分析四大面的實驗數據證實，蟬花萃取物在紫外線造成角膜損傷的實驗動物膜組中，具有預防並改善紫外線造成的傷害，維持並增加淚液量，維持淚液品質，改善並預防角膜神經受損，維護角膜結構，減緩發炎症狀等功效。

#### 4-5 未來發展

上述實驗數據證實，蟬花萃取物在具有預防並改善紫外線造成的眼角膜傷害，其相關機制目前已知只有降低發炎反應，而在組織切片方面有發現攝取高濃度的蟬花萃取物組，具有修復效果的淋巴告細胞數量有增多的趨勢，其可能有促進細胞活化與修復的功能，這方面需藉由實驗來釐清。

本次實驗採用的是蟬花粗萃物，詳細有效成分未知，之後研究方向將朝向將分析且找出蟬花中的成分，蟬花為一價格高昂之中草藥，若能找出其關鍵有效物質，有望未來改以人工合成，降低其成本，廣為推廣來造福大眾。



## 五. 參考文獻

1. Tenkate TD. Occupational exposure to ultraviolet radiation: a health risk assessment. *Rev Environ Health*. 1999;14:187 - 209.
2. Sliney DH. How light reaches the eye and its components. *IntJ Toxicol*. 2002;21:501 - 509.
3. 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.
4. Davanger M, Evensen A (1971) Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 229: 560 - 561.
5. Potten CS. Epidermal cell production rates. *J Invest Dermatol*. 1975;65:488 - 500
6. Tseng SC, Hirst LW, Maumenee AE, Kenyon KR, Sun TT, Green WR. Possible mechanisms for the loss of goblet cells in mucindeficient disorders. *Ophthalmology*. 1984;91:545 - 552.
7. Govindarajan B, Gipson IK. Membrane-tethered mucins have multiple functions on the ocular surface. *Exp Eye Res*. 2010;90:655 - 663
8. Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*. 1989;57:201 - 209.
9. Schlotzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 2005;81:247-64.
10. Kasper M. Heterogeneity in the immunolocalization of cytokeratin specific monoclonal antibodies in the rat eye: evaluation of unusual epithelial tissue entities. *Histochemistry* 1991; 95:613-20.
11. Watanabe H. Significance of mucin on the ocular surface. *Cornea*. 2002; 21:S17 - S22.
12. Lee DH, Kim JK, Joo CK. Translocation of nuclear factor kappaB on corneal epithelial cells induced by ultraviolet B irradiation.

- Ophthalmic Res. 2005;  
37:83 - 88.
13. Black AT, Gordon MK, Heck DE, Gallo MA, Laskin DL, Laskin JD. UVB light regulates expression of antioxidants and inflammatory mediators in human corneal epithelial cells. *Biochem Pharmacol.* 2011;81:873 - 880.
  14. Yin J, Huang Z, Wu B, Shi Y, Cao C, Lu Y. Lornoxicam protects mouse cornea from UVB-induced damage via inhibition of NF- $\kappa$ B activation. *Br J Ophthalmol.* 2008;92:562 - 568.
  15. Hur S, Lee YS, Yoo H, Yang JH, Kim TY. Homoisoflavanone inhibits UVB-induced skin inflammation through reduced cyclooxygenase-2 expression and NF- $\kappa$ B nuclear localization. *J Dermatol Sci.* 2010;59:163 - 169.
  16. Chen BY, Lin DP, Wu CY, et al. Dietary zerumbone prevents mouse cornea from UVB-induced photokeratitis through inhibition of NF- $\kappa$ B, iNOS, and TNF- $\alpha$  expression and reduction of MDA accumulation. *Mol Vis.* 2011;17:854 - 863
  17. 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.
  18. Schein OD, Munoz B, Tielsch JM, et al. Prevalence of dry eye among the elderly. *Am J Ophthalmol.* 1997;124:723 - 728.
  19. Lee AJ, Lee J, Saw SM, et al. Prevalence and risk factors associated with dry eye symptoms: a population based study in Indonesia. *Br J Ophthalmol.* 2002;86:1347 - 1351.
  20. Lin PY, Tsai SY, Cheng CY, et al. Prevalence of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan: the Shihpai Eye Study. *Ophthalmology.* 2003;110:1096 - 1101.
  21. 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.
  22. Quinto GG, Campos M, Behrens A. Autologous serum for ocular surface diseases. *Arq Bras Oftalmol.* 2008;71:47 - 54.
  23. Kojima T, Higuchi A, Goto E, et al. Autologous serum eye drops for the treatment of dry eye diseases. *Cornea.* 2008;27(suppl 1):S25 - S30.
  24. Leibowitz HM, Morello S Jr, Stern M, et al. Effect of topically administered epidermal growth factor on corneal wound strength. *Arch Ophthalmol.* 1990;108:734 - 737.

25. Huo Y, Qiu WY, Pan Q, et al. Reactive oxygen species (ROS) are essential mediators in epidermal growth factor (EGF)-stimulated corneal epithelial cell proliferation, adhesion, migration, and wound healing. *Exp Eye Res.* 2009;89:876 - 886.
26. Zhang Y, Liou GI, Gulati AK, et al. Expression of phosphatidylinositol 3-kinase during EGF-stimulated wound repair in rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:2819 - 2826.
27. Basti S. Ocular toxicities of epidermal growth factor receptor inhibitors and their management. *Cancer Nurs.* 2007;30:S10 - S16.
28. 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.
39. Lin Z, Liu X, Zhou T, et al. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. *Mol Vis.* 2011; 17:257 - 264.
30. Pauly A, Brignole-Baudouin F, Labbe A, et al. New tools for the evaluation of toxic ocular surface changes in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:5473 - 5483.