

行政院國家科學委員會補助  
大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計畫 : 以 LDH 的表現為生物指標評估隱形眼鏡保養液對於小 \*  
\* 名稱 鼠眼球表面細胞的安全性 \*  
\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 羅麗娟  
學生計畫編號： NSC 101-2815-C-040-023-B  
研究期間： 101年07月01日至102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 102年01月24日

# 以 LDH 的表現為生物指標評估隱形眼鏡保養液對於小鼠眼

## 球表面細胞的安全性

羅麗娟 (Li-Jyuan Luo)

指導老師：林培正 教授 (David Pei-Cheng Lin, PhD)

陳伯易 副教授 (Bo-Yie Chen, PhD)

### 研究成果報告

#### 一、摘要：

在台灣近視人口占絕大部分，近視族中有高比例配戴隱形眼鏡，而為了保存隱形眼鏡，每天所使用的保養液必然是不可或缺。尤其使用長戴型隱形眼鏡需要保養液來維持隱形眼鏡的清潔，但是保養液使用完會不會殘留在隱形眼鏡上，那麼過多的保養液殘留對我們的角膜會不會造成衝擊，若是長戴型隱形眼鏡配戴會不會有重複性的刺激造成眼球表面二次傷害？若在保養液中加入一些保護因子看看是否可以當作一個反轉的機制，減少因為過度使用而造成的危險，這個是在商界和學界是令人關心的議題。

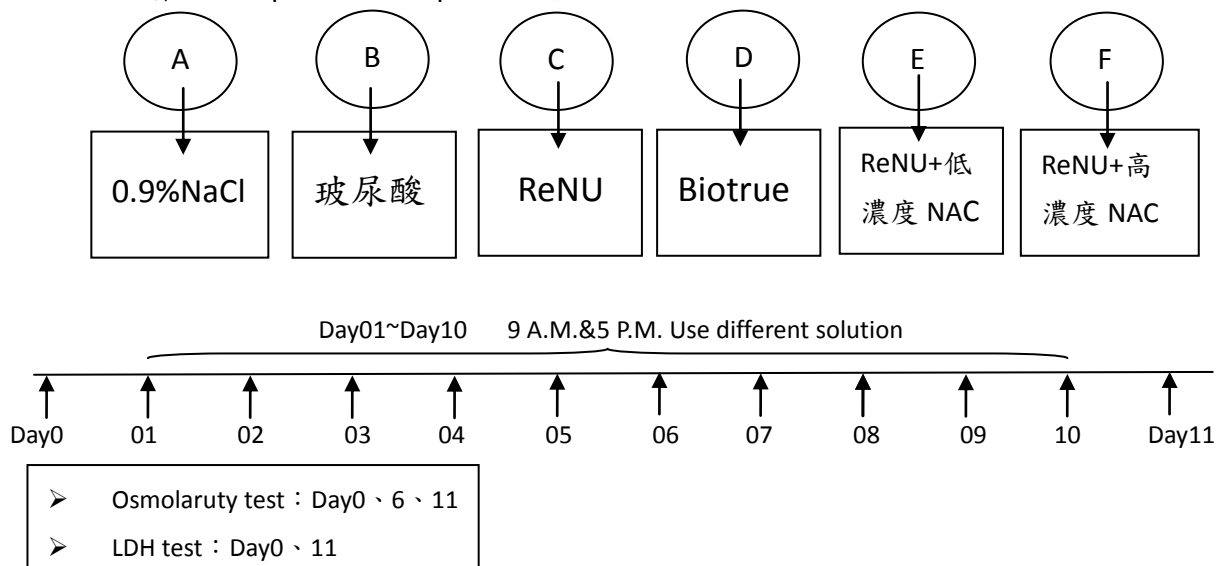
而保養液使用完後是否需要沖洗生理食鹽水，目前說法大相逕庭。此外隱形眼鏡保養液的過度使用亦可能是會造成乾眼症的危險因子，此課題攸關消費者的權益值得深入探討。本研究以此兩個生物指標進行生物的風險評估，並分析過度使用的保養液對小鼠眼睛是否會出現異常？觀察角膜外觀是否有無破損，同時改變乳酸脫氫酶(Lactic dehydrogenase-LDH)的表現？並觀察是否影響結膜杯狀細胞的數目？研究中在小鼠的眼睛內滴入少許保養液後(4.76 $\mu$ l/每個眼睛)，每天2次，持續10天。於實驗第0、6、10、11天採取小鼠淚液進行測試滲透壓(Osmolality)、乳酸脫氫酶(LDH)。乳酸脫氫酶(LDH)主要是因為基質層有受損或是受傷而刺激LDH酵素酶的產生，那又由於此酵素酶會經由擴散作用的方式至淚液層，所以本實驗採取檢驗類液中的LDH量來做一個分析，看看是否可以做為一個評估眼球表面健康的指標。

在第11天犧牲並取出眼睛進行組織切片分析染色。透過乳酸脫氫酶分析和滲透壓的檢測，從這兩個數據上來看是沒有明顯的顯著差異，但眼瞼杯狀細胞數目卻有減少的現象。因此，本研究使用動物平臺實驗來做為一項安全性評估，只要是正確的安全使用量下，保養液便可以使鏡片配戴起來更舒適健康，也可以減少因保養液而嚴重影響眼睛表面健康，是當代發展視力保健衛教的重要課題之一。

**關鍵詞：**隱形眼鏡、隱形眼鏡保養液、角膜、結膜、杯狀細胞、LDH

## 二、 方法：

- A. 實驗器材：ICR小鼠、Pipette、TIP、玻尿酸、博士倫保養液(ReNU)、博士倫保養液(Biotrue)、N-乙醯基半胱氨酸 N-Acetyl-L-Cysteine (NAC)藥劑、烘箱、切片機、玻片、染色所需用到的器材、顯微鏡
- B. 實驗分組：將ICR小鼠分成6組單位(5組實驗組、1組陽性對照組)，每組2隻小鼠，並記錄實驗前每單位老鼠的眼睛外觀狀況。
- C. 保養液：本實驗隨機取用了三種市面上常見的隱形眼鏡相關藥水，分別為「博士倫去蛋白全效保養液」、「博士倫多功能隱形眼鏡藥水」、「玻尿酸人工淚液」。以上三者都屬於會直接接觸眼睛的角膜細胞與結膜組織。在實驗設計時，我們給予小鼠的眼表面積每次所劑量為 4.76 $\mu$ l，相對於一般人所接受的常態劑量的 2 倍，進行模擬試驗。
- D. 保護因子：多數的抗氧化營養素的作用在於本身即是一個抗氧化劑，如維生素 C、E、前花青素、花青素、多酚等，所以本研究採取加入不同濃度的 N-乙醯基半胱氨酸 N-Acetyl-L-Cysteine (NAC)是一種氨基酸，是人體含量最多且存在於每一個細胞的抗氧化劑。
- E. 實驗方法：實驗將 12 隻小鼠分為 6 組，每組 2 隻 ICR 品系小鼠。分別為：A 組為 0.9% NaCl(等張溶液)、B 組為含玻尿酸成分的保養液組、C 組為隱形眼鏡藥水(博士倫保養液 ReNU)、D 組為含隱形眼鏡藥水(博士倫保養液 Biotrue)、E 組為含博士倫保養液 ReNU+低濃度 NAC、F 組為含博士倫保養液 ReNU+高濃度 NAC。連續 10 天，每天早上 (9:00)、及下午 (17:00) 各在每組每隻眼睛內用 Pipette 滴 4.76  $\mu$ l 的不同溶液。



實驗流程最後(Day11)以斷頸法犧牲老鼠，取出眼球與眼瞼並放入固定液，進行脫水和組織包埋處理，再以5 $\mu$ m厚薄度進行組織切片和進行PAS染色(Periodic Acid-Schiff stain)分析。<sup>[參考資料：Molecular Vision: 2011 (accepted; article in press) (SCI); 眼科前25%]</sup>

Dietary zerumbone prevents against ultraviolet B-induced cataractogenesis in the mouse 作者群: Bo-Yie Chen, David Pei-Cheng Lin(指導教授), Kuo-Chen Su, Yi-Ling Chen, Chia-Yung Wu, Mei-Ching Teng, Yuan-Ting Tsai(蔡媛婷), Chi-Yun Sun(孫琦雲), Soo-Ray Wang, and Han-Hsin Chang

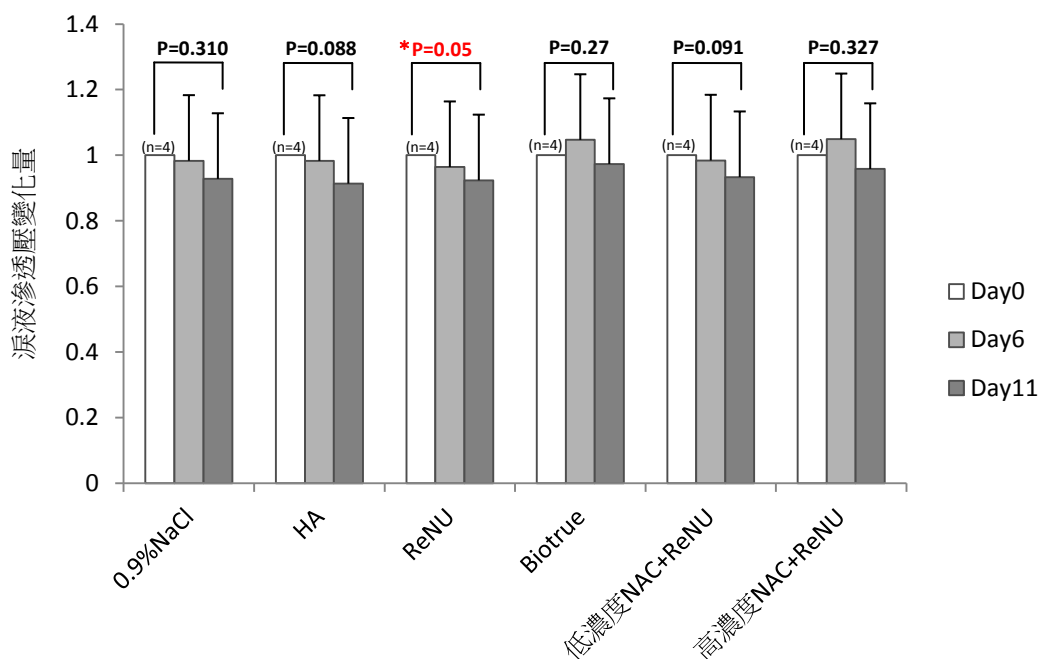
### 三、 實驗分析：

#### (a.) 實驗方法：Osmolarity test (10 $\mu$ l)

實驗目的：觀察淚液滲透壓的數值高低，評估眼球表面健康。

實驗結果：比率測量顯示從第0天到第11天,保養液ReNU滲透壓改變量有顯著的差異，而其他組別有些微下降的趨勢但是並沒有顯著的差異。

( $P>0.05$ , no significant \* $P<0.05$ , significant) (Mann-Whitney U test 檢定)

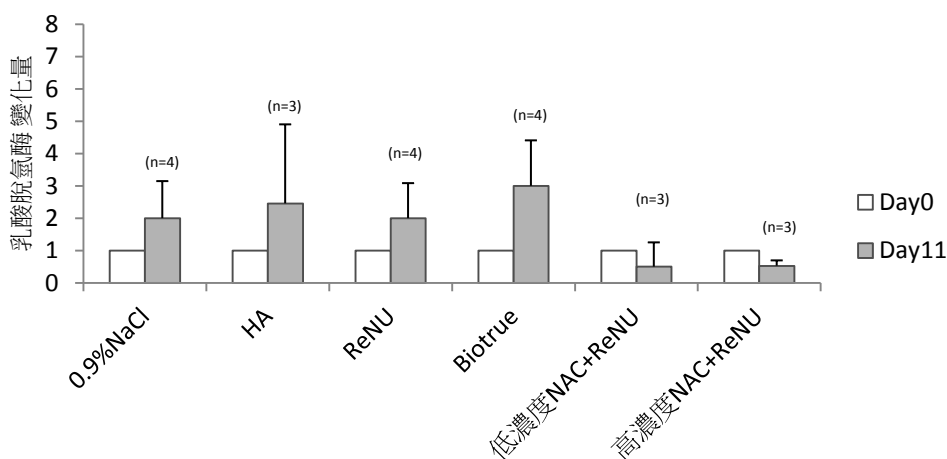


#### (b.) 實驗方法：抽取淚液評估 LDH 的含量

實驗目的：當細胞受傷時LDH會由基質層釋放出來，經由滲透作用 到達淚液層，所以本實驗觀察乳酸脫氫酶的數值高低，評估眼球表面健康。

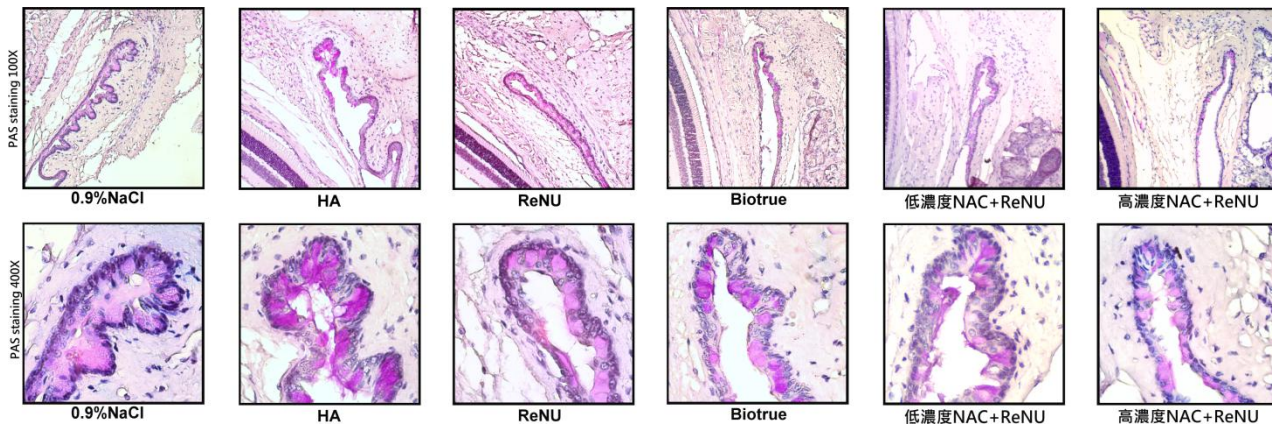
實驗結果：在加入NAC的化學成分後，LDH 的數值有明顯下降的趨勢，這可以當作是眼球表面評估的指標之一。

( $P>0.05$ ,no significant \* $P<0.05$ ,significant) (Mann-Whitney U test 檢定)

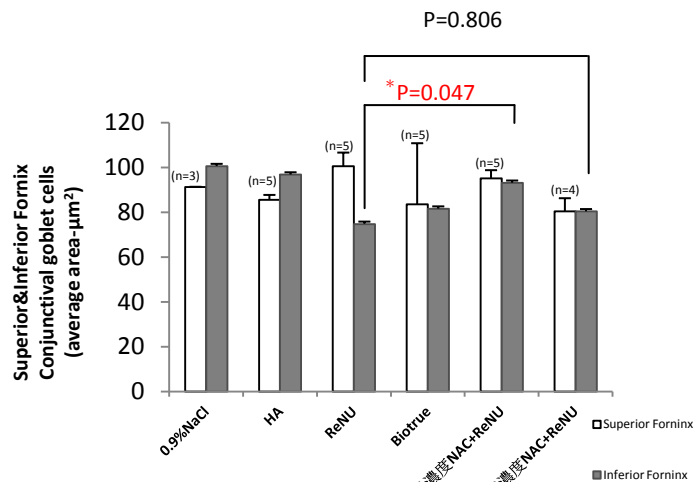
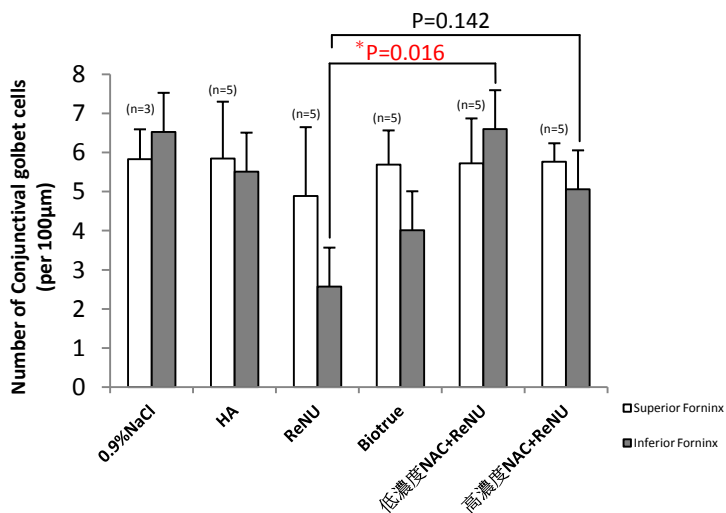
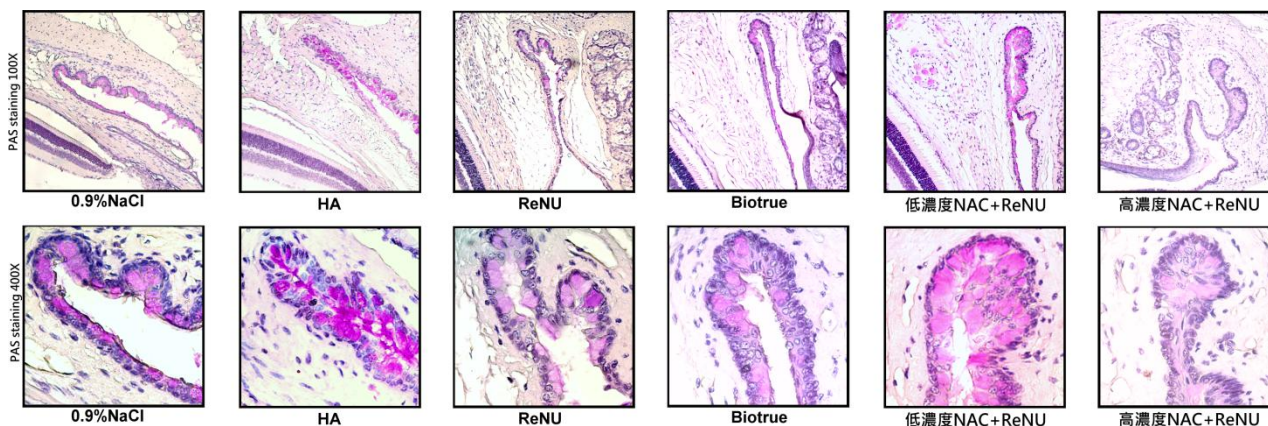


(c.) 實驗方法：以400倍 觀察PAS染色 (Periodic Acid-Schiff stain) 結果  
 實驗目的：評估上下穹窿結膜上皮杯狀細胞數目  
 實驗結果：以統計結果來看加入 NAC 可以有效保護杯狀細胞，減少下  
 穹窿處的杯狀細胞退化的程度。  
 (P>0.05,no significant \*P<0.05,significant) (Mann-Whitney U test 檢定)

### 【Superior Fornix】



### 【Inferior Fornix】



#### 四、 結果與討論：

長戴型隱形眼鏡一般可分為月拋及季拋等樣式，長戴式隱形眼鏡的清潔須依賴保養液，但是殘留在上面的保養液是否會對我們的眼睛造成傷害，過去已有研究發現隱形眼鏡的清潔保養藥水，可能會造成乾眼症的危險因子，此議題攸關消費者的權益值得深入探討。本研究藉由小鼠為實驗平台，評估並模擬保養液殘留於眼球表面之影響效應，實驗過程中採集小鼠淚液，檢測淚液滲透壓(Osmolarity)、以及淚液中乳酸脫氫酶(LDH)的濃度這兩項生物指標進行生物的風險評估，反映出隱形眼鏡保養液的安全性，供消費者在選用相關商品時，作為可靠的參考依據。

實驗分成6組分別為使用生理食鹽水、玻尿酸、不同保養液2組、以及在保養液中加入不同濃度的保護因子N-乙醯基半胱氨酸(NAC)2組，實驗為期10天。實驗結果發現，在第一項生物指標測試中6組Osmolarity都呈現下降的趨勢；在第二項生物指標LDH中，使用保養液(ReNU)組在淚液中LDH濃度呈現上升的趨勢，而加入不同濃度保護因子(NAC)中淚液中LDH濃度呈現下降的趨勢。未來值得探討長期使用後(搭配隱形眼鏡保養液正常使用時間30或90天)，此兩項指標持續變化量。實驗在第10天進行犧牲，取下小鼠眼球進行組織切片、PAS (Periodic Acid-Schiff)染色，實驗結果發現使用保養液(ReNU)組，在下穹窿結膜處的杯狀細胞有明顯的減少，在統計上 $P < 0.05$ 達顯著差異(Mann-Whitney U test 檢定)，另一結果發現，在保養液中加入不同濃度的NAC，杯狀細胞密度明顯的比保養液(ReNU)有較高的PAS表現，在統計上 $P < 0.05$ 達顯著差異(Mann-Whitney U test 檢定)，由此證明NAC能有效保護杯狀細胞，反轉藥水所造成杯狀細胞退化的表現。

本研究確認保養液功能的生物意義外，亦提供一個有效的生物測試平台及可作為眼球表面健康評估生物指標。若在保養液中加入一些保護因子是可以當作一個反轉的機制，減少因為過度使用而造成的乾眼症危機，這個是在隱形眼鏡市場上和學界是令人關心的議題，並可應用於驗證目前隱形眼鏡保養液安全性。



五、 資料來源：

- (i) 台北視光中心(2009)
- (ii) 國民健康局，近視流行病學之防治文獻彙整研究報告
- (iii) Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 January; 52(1): 30–35.
- (iv) Mol Vis. 2009; 15: 108–119. Published online 2009 January 16.
- (v) J Histochem Cytochem. 2009 February; 57(2): 177–185.
- (vi) Orphanet J Rare Dis. 2009; 4: 7.
- (vii) Korean J Ophthalmol. 2007 December; 21(4): 251–254.
- (viii) Mol Cell Biol. 2007 January; 27(1): 182–194
- (ix) Molecular Vision: 2011 (accepted; article in press) (SCI; 眼科前 25%)  
Dietary zerumbone prevents against ultraviolet B-induced cataractogenesis in the mouse  
作者群: Bo-Yie Chen, David Pei-Cheng Lin(指導教授), Kuo-Chen Su, Yi-Ling Chen, Chia-Yung Wu, Mei-Ching Teng, Yuan-Ting Tsai(蔡媛婷), Chi-Yun Sun (孫琦雲), Soo-Ray Wang, and Han-Hsin Chang]
- (x) Safety evaluation of the contact lens solutions on market using a mouse model. (2011 年元培健康與管理學術研討會)  
作者群：Bo-Yie Chen, David Pei-Cheng Lin(指導教授), Han-Hsin Chang, Pei-Shan Li, Li-Jyuan Luo(羅麗娟), Li-Chien Yang, Hsiang-Jui Liu, Lin-Song Chang

