

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
* : 雌激素受體對於視網膜神經細胞的保護機制之探討
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 林香吟
學生計畫編號： NSC 101-2815-C-040-035-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： 曾廣文

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學視光學系

中華民國 102年03月01日

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

** 計畫名稱：雌激素受體對於視網膜神經細胞的保護機制之探討 **
**

執行計畫學生：林香吟

學生計畫編號：NSC 101 -2815-C-040-035-B

研究期間：101年7月1日至102年2月底止，計8個月

指導教授：曾廣文 老師

處理方式（請勾選）：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學視光學系

中華民國 102年 2月 28日

(一) 摘要

雌激素受體

雌激素藉由與雌激素受體 (estrogen receptor; ER) 結合，會引發一連串的生理反應，如：抗發炎反應、保護神經細胞、促進細胞增生等等。雌激素與雌激素受體結合的路徑有兩種，最主要的路徑是雌激素與雌激素受體結合後會移動至細胞核內，藉由DNA結合區 (DNA-binding; DBD) 與雌激素反應元素 (estrogen receptor element; ERE) 結合引發轉錄作用，此機制通常要花費數小時以上才能完成；另一條路徑是位在細胞膜上的雌激素受體經活化後藉由MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 快速作用只需耗費幾秒或幾分鐘時間即可完成。而此作用若被雌激素受體拮抗劑 (ICI 182780; ICI) 所拮抗，則一連串生理反應皆無法進行。

雌激素受體為一種被雌激素活化的受體，分成雌激素受體 α (ER α) 和雌激素受體 β (ER β)，在人體內分佈位置受到性別和年齡上的差異而略有不同。但不論性別和年紀，眼睛中都存在 ER α 和 ER β ，雌激素與雌激素受體兩者的結合，具有保護視網膜神經纖維層 (Deschênes et al.,2010) 及視網膜神經細胞的能力。視網膜神經細胞包含雙極細胞、水平細胞、感光細胞等。

視網膜感光細胞

視網膜感光細胞是視網膜中第一個吸收到外界傳進來的光線，其功能是直接接受光子的能量，並將光能轉變為神經訊息，若感光細胞受損，對視力有極大的影響力。研究指出感光細胞受損有一部分原因是燈光的照射，照射光線能量的強弱會造成視網膜受損的程度有所不同。光線對於眼睛傷害中較為人知的為紫外線 (UV light) 與藍光 (Blue light)。紫外線在穿透眼睛組織時，被角膜和水晶體大量吸收，不易抵達視網膜 (Yang et al.,2007)；藍光由於波長較短、穿透力較強，不易被角膜和水晶體吸收，所以大部分藍光會穿透組織抵達視網膜，造成視網膜感光細胞的傷害 (Roehlecke et al.,2011)。現今所使用的LED (Light-emitting diodes) 有些含有能量較強的藍光波長，長時間使用含有藍光波長較強的LED光源，可能會對眼睛造成某些程度上的傷害。

兒茶素

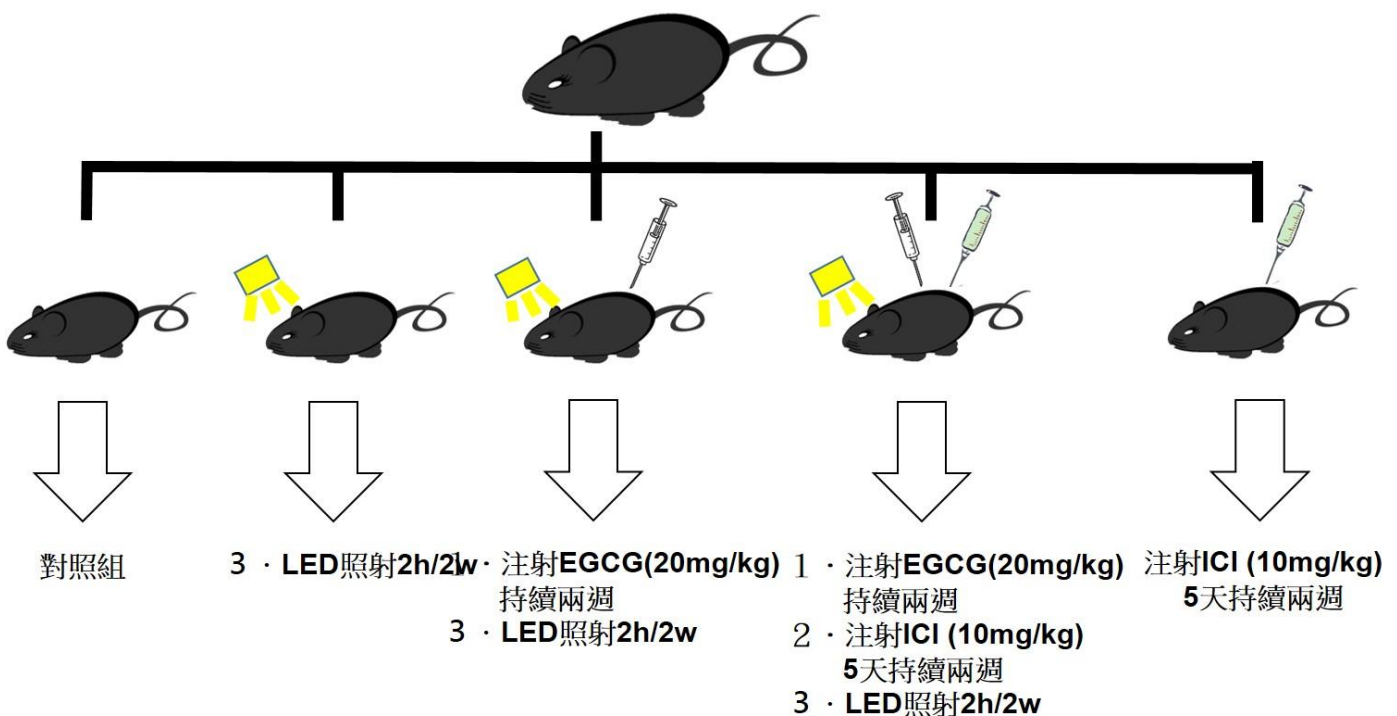
兒茶素為現今最廣為人知具有抗氧化能力的物品，綠茶中含有的兒茶素 (Catechins) 能穿透眼部組織，並幫助眼睛避免氧化壓力。兒茶素其化學結構含有氫氧基，可阻止自由基對人體的破壞，當氫氧基越多，抗氧化效力也越強 (Nakazato et al.,2007)。兒茶素的萃取物中含有四種較著名的成分 epigallocatechin gallate (EGCG)、epigallocatechin (EGC)、epicatechin gallate (ECG)、epicatechin (EC)。這之中，尤以EGCG含量最多、抗氧化能力最強。EGCG有抗氧化、抗菌、抗過敏、抗老化及保護神經細胞。也有研究證實在中樞神經系統中，EGCG會促進雌激素受體量的增加 (Goodin et al.,2002)。

(二) 研究方法及步驟

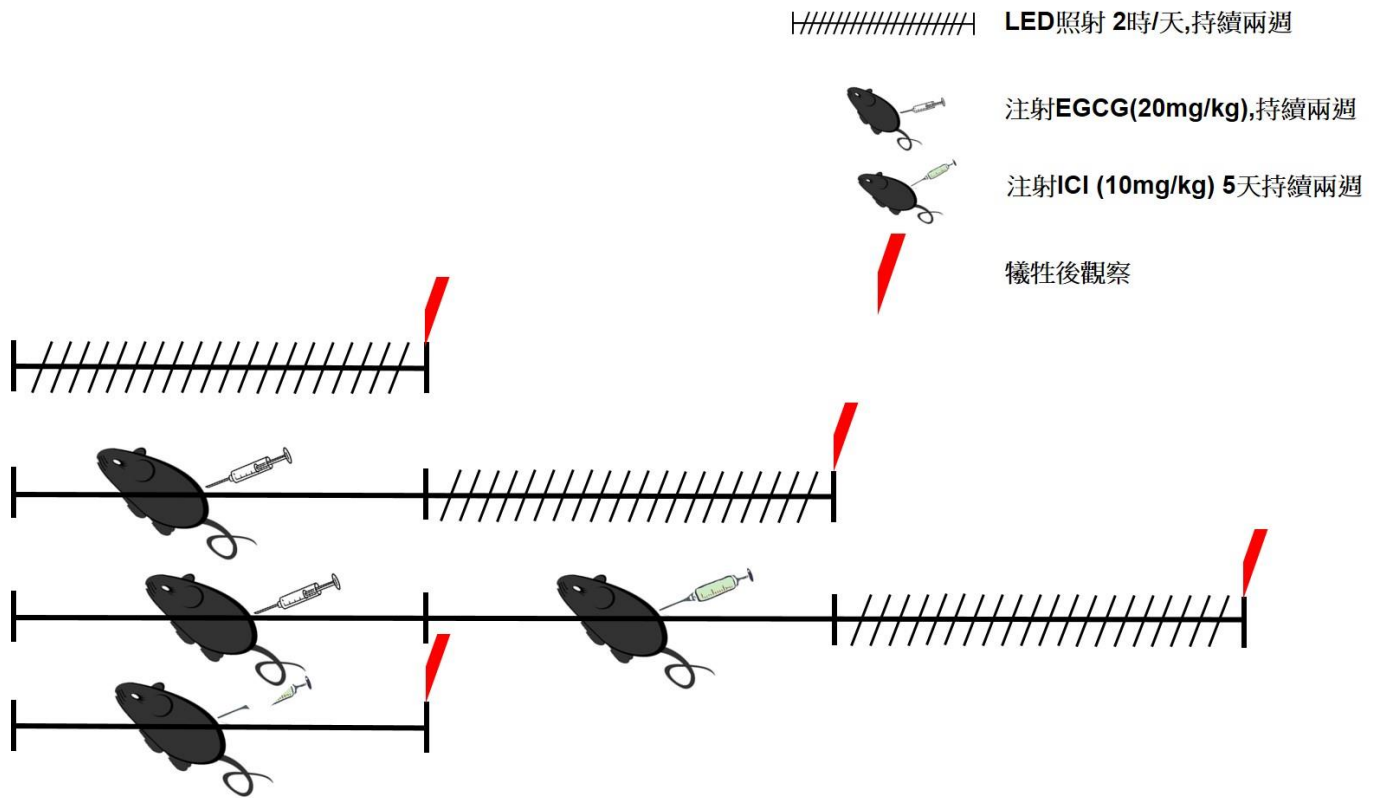
實驗步驟

1. 30 隻 C57BL/6 小鼠分成五組，分別為對照組、LED 光線照射組、先施打 EGCG (20mg/kg) 後再 LED 光線照射組、施打 ICI (10mg/kg) 組、先施打 EGCG (20mg/kg) 後再施打 ICI (10mg/kg) 組接著進行 LED 光線照射組。
2. 給予小鼠 LED 光線照射每次兩個小時持續兩週，利用組織切片染色結果與對照組相比，探討光線照射兩週後所造成的光傷害。
3. 預先施打 EGCG 兩週後，再給予小鼠 LED 光線照射每次兩個小時持續兩週，利用組織切片和對照組及 LED 光線照射組做相比，探討 EGCG 在光傷害下所具有的保護作用。
4. 預先施打 EGCG 兩週後，再給予小鼠施打 ICI 五天持續兩週，接著給予小鼠 LED 光線照射每次兩個小時持續兩週組，利用組織切片和 LED 光照組相比，探討 EGCG 是否可藉由誘導雌激素受體產生保護作用。
5. 施打 ICI 五天持續兩週，利用組織切片和對照組及先施打 EGCG (20mg/kg) 後再 LED 光線照射組以及預先施打 EGCG 兩週後，再給予小鼠施打 ICI 五天持續兩週，接著給予小鼠 LED 光線照射每次兩個小時持續兩週組相比後，探討 ICI 是否有傷害視網膜神經細胞的特性。

實驗設計



實驗模式圖



實驗流程

實驗方法

對照組

測驗小鼠體內雌
激素受體是否在
光傷害後不具有
保護作用

測驗小鼠體內雌
激素受體是否具
有保護作用

驗證小鼠體內雌
激素受體是否
EGCG所誘導

測驗小鼠體內雌
激素受體被阻斷
後是否會有傷害
產生

LED 2h/2w

EGCG 2w
+LED 2h/2w

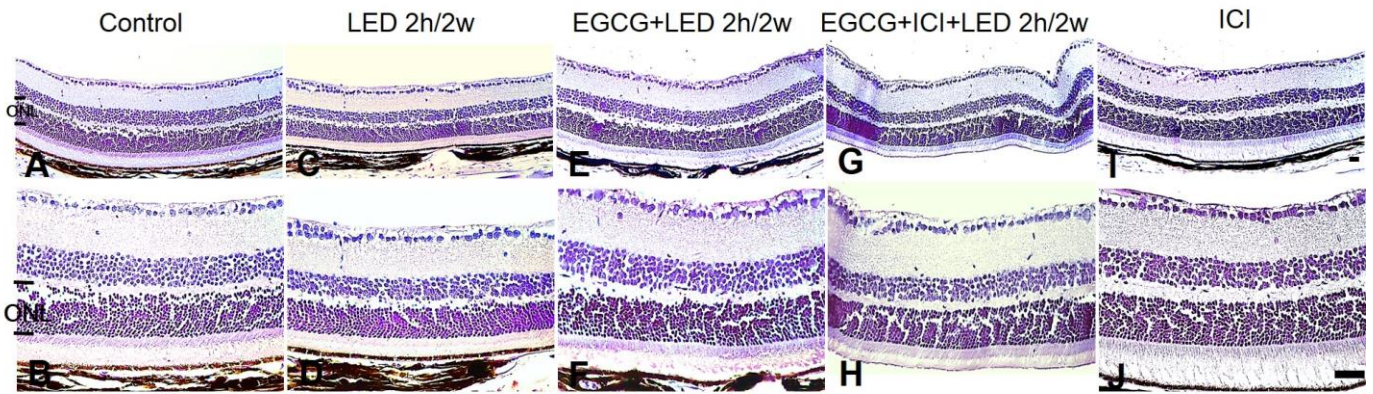
ICI 5d持續2w

EGCG 2w
+ICI 5d持續2w
+ LED 2h/2w

組織蠟切片

H-stain

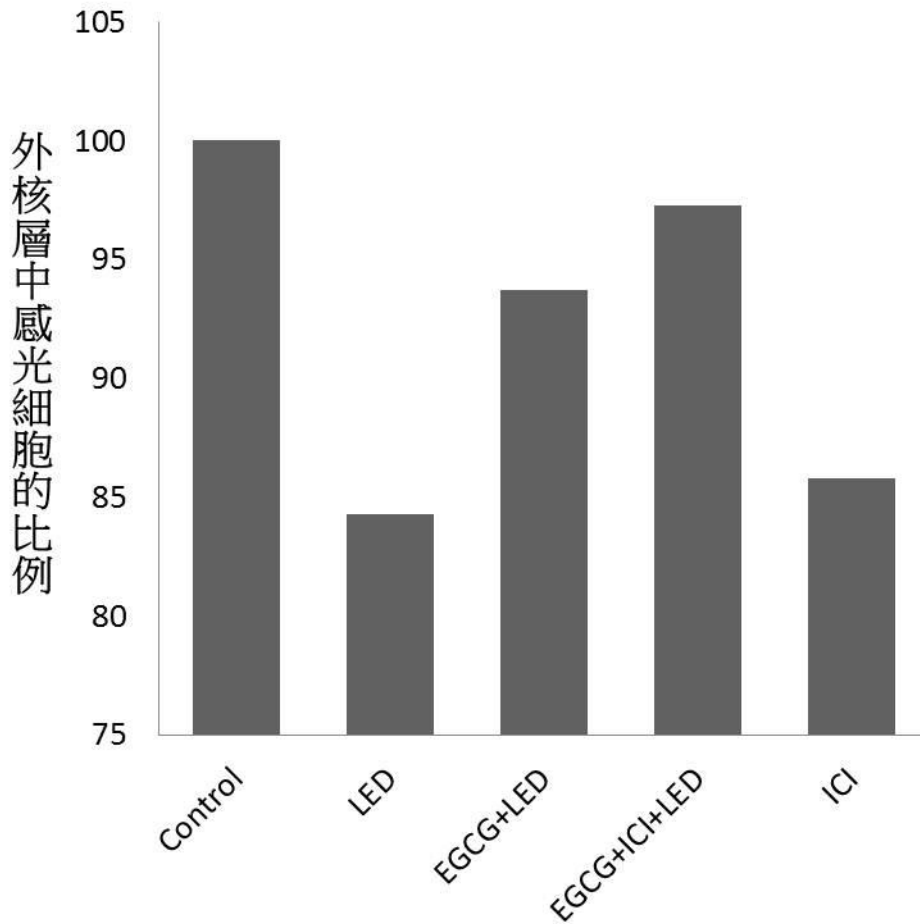
(三) 結果



(圖一)

圖 A、B 為對照組。圖 C、D 為 LED 照射每天 2 小時持續兩週組。圖 E、F 為注射 EGCG(20mg/kg) 兩週，接著 LED 照射每天 2 小時持續兩週組。圖 G、H 為注射 EGCG (20mg/kg) 兩週，再注射 ICI (10mg/kg) 五天持續兩週，最後使用 LED 照射每天 2 小時持續兩週組。圖 I、J 為注射 ICI(10mg/kg) 五天持續兩週組。

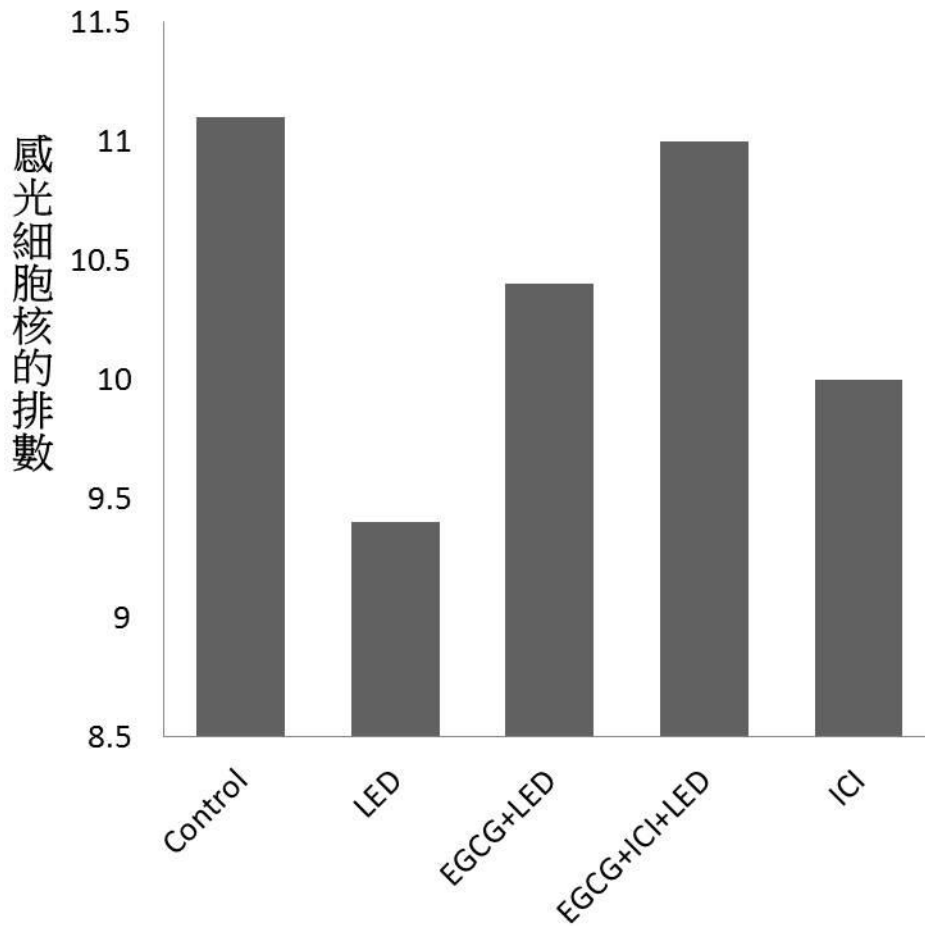
本實驗證實，LED 照射傷害組 (圖 C、D) 與對照組 (圖 A、B) 相比，視網膜外核層的厚度有明顯減少的情況，推測 LED 光照具有對視網膜神經細胞的傷害。EGCG+LED 組 (圖 E、F) 與傷害組 (圖 C、D) 相比，視網膜外核層的厚度較無明顯減少的情況，證實 EGCG 具有對視網膜神經細胞不受光線照射影響的保護作用。圖 G、H，加入 ICI 後，在雌激素受體被阻斷下，光線照射仍然造成視網膜外核層的損傷，使得視網膜厚度減少，可以發現藉由 EGCG 誘導雌激素受體的增多，對視網膜神經細胞產生保護的作用。單純加入 ICI 組 (圖 I、J) 與對照組相比，視網膜外核層的厚度無明顯減少情況，證實 ICI 本身不具有傷害視網膜神經細胞的毒性。



(圖二)

實驗結果發現，在單位面積下，對照組的單位面積內視網膜外核層感光細胞的比例最多，其次為 ICI 組，EGCG+LED 組，EGCG+ICI+LED 組，LED 組。

實驗證明，在 LED 組的光線照射下，使單位面積內視網膜外核層感光細胞的比例有明顯的減少。與傷害組相比，EGCG+LED 組，與對照組相比，因為 EGCG 誘導雌激素受體所產生的保護作用，故單位面積內視網膜外核層感光細胞的比例較無明顯減少。EGCG+ICI+LED 組，藉由雌激素受體拮抗劑 (ICI) 的阻斷，產生對視網膜神經細胞的傷害，使單位面積內視網膜外核層感光細胞的比例比正常組少。此外，單純加入雌激素受體拮抗劑 (ICI)，經統計數據發現，單位面積內視網膜外核層感光細胞與對照組的比例相似。



(圖三)

實驗結果發現，對照組的視網膜外核層感光細胞約為 11~12 層，LED 組約為 9~10 層，EGCG+LED 組約為 10~11 層，EGCG+ICI+LED 組約為 9~10 層，ICI 組約為 11~12 層。

實驗證明，在 LED 組的光線照射，視網膜神經細胞的層數有明顯的減少。加入 EGCG 後，因為 EGCG 誘導雌激素受體產生的保護作用，使得視網膜神經細胞的層數較無明顯減少。在 EGCG 注射後再加入雌激素受體拮抗劑 (ICI)，發現將雌激素受體阻斷後，會減少雌激素受體與雌激素的結合，進而使降低保護作用。單純加入 ICI，發現視網膜神經細胞的層數與對照組相比，層數無明顯的減少。

(四) 討論

綠茶內所含的綠茶素為多酚類的一種，其最主要的四種萃取物中以兒茶素 (epigallocatechin gallate; EGCG) 的含量最多、抗氧化能力最強且對人體健康有很大的助益。近年來，許多相關研究報告指出EGCG具有清除自由基、延緩老化、抑制血壓、降低血中膽固醇、抗輻射以及紫外線等有益於人體的功效。也有研究證實在中樞神經系統中，EGCG會促進雌激素受體量的增加 (Goodin et al., 2002)。

現今眼部保健食品多以葉黃素為主，葉黃素是構成人眼視網膜黃斑區域的主要色素，且無法自行製造，當人體內缺乏這種元素，眼睛就會逐漸失明。葉黃素為一種抗氧化劑，能夠在人體內執行強大的抗氧化保護功能，保護眼睛避免自由基的傷害，並有效過濾短波藍光，避免短波藍光傷害到視網膜，還能有效的抑制光氧化所造成的衰退現象，保護視網膜內黃斑部組織不受損害，形成保護作用。

本篇研究藉由兒茶素 (EGCG) 去誘導雌激素受體對於視網膜神經細胞的保護作用作為探討。目前已有研究證實，兒茶素 (EGCG) 在許多人體實驗，例如阿茲海默症的預防以及心血管疾病的控制等，皆具有顯著的效果。而這些實驗也證實了兒茶素 (EGCG) 在適當的攝取下對人體有益。除此之外，也有實驗證明兒茶素 (EGCG) 可增加眼部組織抗氧化的能力。

本篇實驗證實兒茶素 (EGCG) 在視網膜神經細胞中能夠利用誘導雌激素受體去保護視網膜神經細胞的能力，在短波長藍光的照射下，視網膜神經細胞由於保護作用機制的產生，故不易造成視網膜神經細胞的傷害。由於兒茶素 (EGCG) 及葉黃素的功能十分相似，兩者皆可在人體內進行抗氧化的保護功能，除此之外，兒茶素 (EGCG) 還能夠誘導雌激素受體進行視網膜神經細胞的保護功能，且兒茶素 (EGCG) 和葉黃素皆能避免短波長藍光對於視網膜神經細胞產生的傷害。雖然兩者的功能十分相似，但獲取方法卻不相同，兒茶素 (EGCG) 可藉由綠茶素中獲取，比葉黃素需透過萃取取得更加便利許多，或許未來會因兒茶素 (EGCG) 簡易取得的情況下，使得兒茶素 (EGCG) 能夠如同現今的葉黃素一樣廣為人知，也廣泛的運用在保護視網膜神經細胞中。

(六) 參考文獻

1. Ali Pedram , Mahnaz Razandi , Douglas C. Wallace , Ellis R. Levin. 2006. Molecular Biology of the Cell. May (17) : 2125-2137
2. Deschênes MC , Descovich D , Moreau M , Granger L , Kuchel GA , Mikkola TS , Fick GH , Chemtob S , Vaucher E , Lesk MR. 2010. Postmenopausal hormone therapy increases retinal blood flow and protects the retinal nerve fiber layer. Invest Ophthalmol Vis Sci. May; 51 (5) :2587-600.
3. Goodin MG , Fertuck KC , Zacharewski TR , Rosengren RJ. 2002. Estrogen receptor-mediated actions of polyphenolic catechins in vivo and in vitro. Toxicol Sci. Oct; 69 (2) :354-61.
4. Giddabasappa A , Bauler M , Yepuru M , Chaum E , Dalton JT , Eswaraka J. 2010. 17- β estradiol protects ARPE-19 cells from oxidative stress through estrogen receptor- β . Invest Ophthalmol Vis Sci. Oct; 51 (10) :5278-87.
5. Irwin RW , Yao J , To J , Hamilton RT , Cadenas E , Brinton RD.2012.Selective oestrogen receptor modulators differentially potentiate brain mitochondrial function. J Neuroendocrinol. Jan; 24 (1) :236-48.
6. Levites Y , Weinreb O , Maor G , Youdim M. B. H , Mandel S. 2001. Green tea polyphenol (-) -epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1 , 2 , 3 , 6- tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. J. Neurochem. (78) :1073-1082
7. Levites , Y. , Amit , T. , Youdim , M.B. , and Mandel , S. 2002. Involvement of protein kinase C activation and cell survival/cell cycle genes in green tea polyphenol , (-) -epigallocatechin-3-gallate neuroprotective action. J. Biol. Chem. (277) : 30574-30580
8. Li Y , Yuan YY , Meeran SM , Tollefsbol TO. 2010. Synergistic epigenetic reactivation of estrogen receptor- α (ER α) by combined green tea polyphenol and histone deacetylase inhibitor in ER α -negative breast cancer. Mol Cancer. Oct 14; (9) :274.
9. Nakazato T , Sagawa M , Yamato K , Xian M , Yamamoto T , Suematsu M , Ikeda Y , Kizaki M. 2007. Myeloperoxidase is a key regulator of oxidative stress mediated apoptosis in myeloid leukemic cells. Clin Cancer Res. Sep 15; (13) :5436-45.
10. Roehlecke C , Schumann U , Ader M , Knels L , Funk RH. 2011. Influence of blue light on photoreceptors in a live retinal explant system. Mol Vis. Apr 8; (17) :876-84.
11. Tsumura K , Suzuki A , Tsuzuki T , Tanimoto S , Kaneko H , Matsumura S , Imoto M , Umezawa K , Takahashi D , Toshima K. 2011. Molecular design , chemical synthesis , and biological evaluation of agents that selectively photo-degrade the transcription factor estrogen receptor- α . Org

Biomol Chem. Sep 21; 9 (18) : 6357 – 6 6 .

12. Yang SW , Lee BR , Koh JW. 2007. Protective effects of epigallocatechin gallate after UV irradiation in cultured human retinal pigment epithelial cells. Korean J Ophthalmol. Dec; 21 (4) :232-7.
13. Zhao L , Wu TW , Brinton RD. 2004. Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons. Brain Res. Jun 4; (1010) :22-34.