

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫 : 以視覺功能與視網膜組織退化地形圖相關性分析策略 *
* 名稱 : 探討番紅花活性成分的視網膜保健功效 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 吳佳蓮

學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-015-B

研究期間： 105年07月01日至106年02月28日止，計8個月

指導教授： 陳伯易

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： 中山醫學大學視光學系(所)

中華民國

106年03月26日

以視覺功能與視網膜組織退化地形圖相關性分析策略探討番紅花 活性成分的視網膜保健功效

學生： 吳佳蓮 (Sheng-Chiao-Wang)

指導教授： 陳伯易 副教授 (Bo-Yie Chen)

劉智誠 醫師 (Jym-cheng, Liou)

一、摘要：

前期大專生計畫實驗成果指出番紅花(Saffron)活性成分能有效預防LED高能量可見光 (Light Emitting Diode)對小鼠的視覺敏感度(視力)造成的衰退。實驗設計分別為正常的空白對照組(Blank control group)、LED光照誘導視覺退化組(LED group)、LED光照並服以番紅花(Saffron)活性成分預防組(LED + Saffron group)。於光照期間小鼠的視力持續衰退，相較之下在番紅花(Saffron)活性成分預防組(LED + Saffron group)小鼠視力值可維持較好的狀態。本期實驗繼續前期的研究，採取視網膜組織病理分析方法，研究目標探討視網膜組織層的病理變化。實驗分析策略採取視網膜解剖方位之Superior-Inferior空間軸進行視網膜組織退化地形圖評量分析，將outer nucleus layer of photoreceptor cells (ONL)、outer-inner segments of photoreceptor cells (OS/IS)厚度的病理性變化情形量，沿著Superior-Inferior空間軸進行評估定量分析，系統性的驗證番紅花活性成分的視網膜保健功效。

關鍵字：番紅花(Saffron)活性成分、視覺功能、視網膜組織退化、小鼠模式

二、研究動機與研究問題：

- (1) LED高能量可見光 (Light Emitting Diode) 被廣泛使用於日常照明，LED高能量可見光 (Light Emitting Diode) 長期使用對眼睛造成的危害不容小覷。
- (2) 葉黃素存在於眼睛黃斑部，葉黃素能有效吸收高能量光源，是目前被廣泛使用的護眼產品。不同於葉黃素，番紅花(Saffron)活性成分主要為水溶性方便人體吸收並有活血化瘀的效果。前期實驗著重視覺功能性評估，結果發現番紅花(Saffron)活性成分能有效預防小鼠眼睛功能性退化。

本實驗計畫著重於視網膜的病理分析，目標於觀察視網膜感光細胞(photoreceptor)的健康，實驗分析策略採取視網膜解剖方位之Superior-Inferior空間軸進行組織切片和形態分析，透過視網膜組織退化地形圖評量分析模組將outer nucleus layer of photoreceptor cells (ONL)、outer-inner segments of photoreceptor cells (OS/IS)厚度的病理性變化量畫出來。以釐清視網膜組織病理的變化是否與功能性分析的結果是否有同步的趨勢。

三、文獻回顧與探討：

(1) LED 高能量可見光 (Light Emitting Diode)：

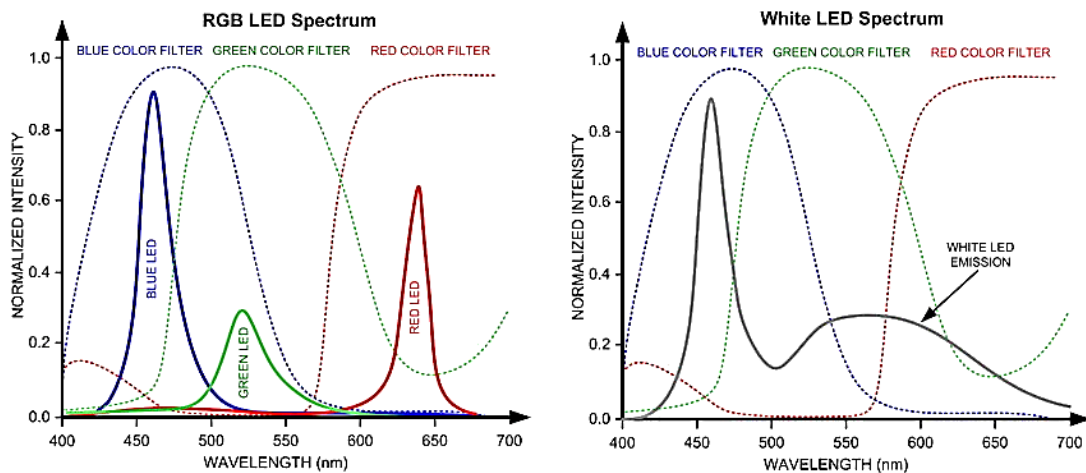
LED 高能量可見光 (Light Emitting Diode) 為發光二極體，常見的白色 LED 是紅、藍、綠三色光混合而成。目前市售的 LED 白光是用短波長藍色光或紫外光單一光源再用螢光的方法產生綠光及紅光混和成常見的白光 LED 燈^(1,2,3)。從 LED 光譜圖可知 LED 波長峰值在 400-500nm，屬於高能量可見光範圍。眼睛進行光反應過程中會產生自由基，引起發炎反應，造成視網膜損害。若能有效減緩發炎反應，能達到視網膜保護的功效⁽⁴⁾。

(1.資料來源：東曜 LED 科技股份有限公司 http://www.dytc.com.tw/hot_cg4452.html)

(2.資料來源：<http://www.rohm.com.cn/web/china/led-lighting/lecture/led2>)

(3.Effects of blue light on the circadian system and eye physiology 作者群：Gianluca Tosini,¹Ian Ferguson,²Kazuo Tsubota³)

(4. Yoshiaki Kuse, Kenjiro Ogawa, Kazuhiro Tsuruma, Masamitsu Shimazawa, and Hideaki Hara,(2014),Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light)



(圖片來源：<http://article.pchome.net/content-1316729-all.html>)

(2) 番紅花：

番紅花 (Saffron) 或稱藏紅花、西紅花，是西班牙常見的香料。番紅花可以使用的部位是雌蕊中的 3 跟柱頭。過去番紅花常用於料理、布料染色，藥材上也用於活血或瘀、散淤解痛^(5,6,7,8)。近年文獻研究指出番紅花有抗氧化⁽⁹⁻¹⁶⁾、抗發炎^(13,17,19)、保護視網膜⁽¹⁹⁻²⁵⁾、抑制腫瘤^(26,27,28)、降低膽固醇的功效也被用於心血管疾病^(29,30)、保護肝臟⁽³¹⁾、腎臟⁽³²⁾及腦部^(40,41)上。

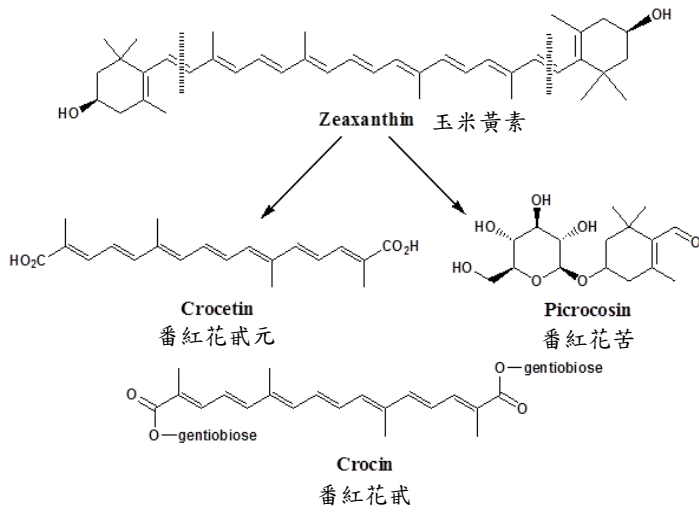
番紅花主要成分如下：含番紅花甙(crocine)約 2%，番紅花苦甙(picrocrocine)約 2%，番紅花醛(safranal)約 0.4%~1.3%。胡蘿蔔素類含有 α -和 β -胡蘿蔔素、玉米黃質 (zeaxanthin)，番茄紅素(lycopene)及 α -和 β -番紅甙元等^(6,7)。

	成分
番紅花中的色素	2% 番紅花甙 (crocin) 2% 番紅花苦甙 (picrocrocin) 0.4%~1.3% 番紅花醛 (safranal) XQY
胡蘿蔔素系列	α -和 β -胡蘿蔔素 玉米黃質 (zeaxanthin) 番茄紅素 (lycopene) α -和 β -番紅甙元等。

(表格自製 參考 MrE <http://eric-soilwater.blogspot.tw/2013/01/blog-post.html>)

番紅花甙(crocin)是番紅花甙元(crocetin)與二分子龍膽雙糖結合成的二元酯。(picrocrocin)

水解後產生番紅花醛(safranal)及葡萄糖



(圖片來源：<http://www.leffingwell.com/saffron.htm>)

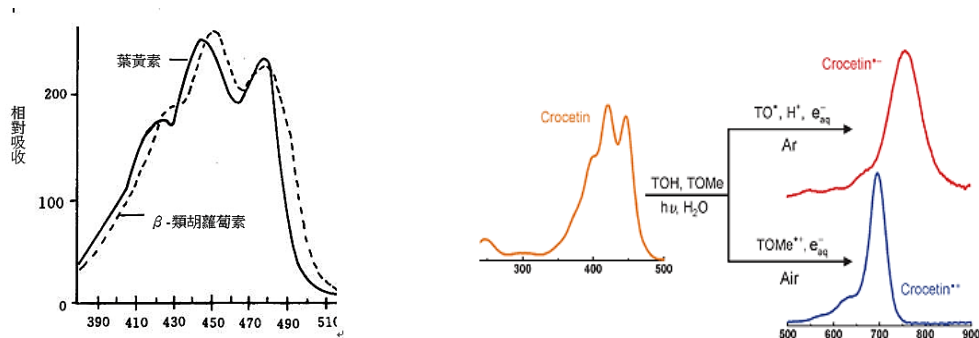


(左圖圖片來源：<http://www.fit365.com.tw/product-info.asp?id=81>)

(右圖圖片來源：MrE. <http://eric-soilwater.blogspot.tw/2013/01/blog-post.html>)

(3) 番紅花與葉黃素比較：

葉黃素是黃斑中心 (fovea) 主要的色素，為脂溶性⁽³⁴⁾。從葉黃素及番紅花(Saffron)吸收波長可看出，兩者吸收光波峰皆在低頻率可見光範圍。高能量光線照射下，能達到保護眼睛的作用。葉黃素為少數可以通過眼睛 BRB (Blood Retina Barrier) 的類胡蘿蔔素 (Carotenoids)^(34,37)。番紅花(Saffron)為水溶性，容易被腸道吸收^(36,38)且文獻指出能通過 BBB (Blood Brain Barrier)^(38,39)。在前期實驗中餵食番紅花活性成分能有效提升小鼠視力及保護視網膜受到 LED 高能量可見光(Light Emitting Diode)所帶來的衰退。

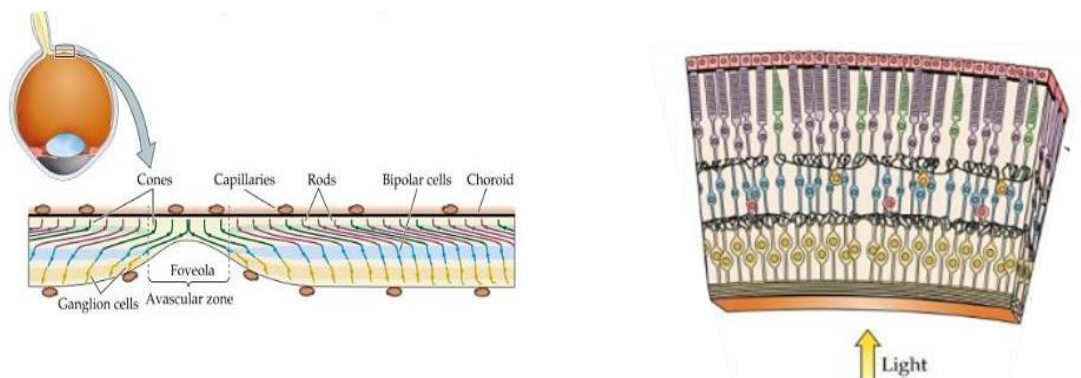


(左圖圖片來源：<http://mulicia.pixnet.net/blog/post/24672779-%E9%97%9C%E6%96%BC%E8%91%89%E7%B6%A0%E7%B4%A0%E5%8F%8A%E8%91%89%E9%BB%83%E7%B4%A0%E9%82%84%E6%9C%89%E9%A1%9E%E8%83%A1%E8%98%BF%E8%94%94%E7%B4%A0>)

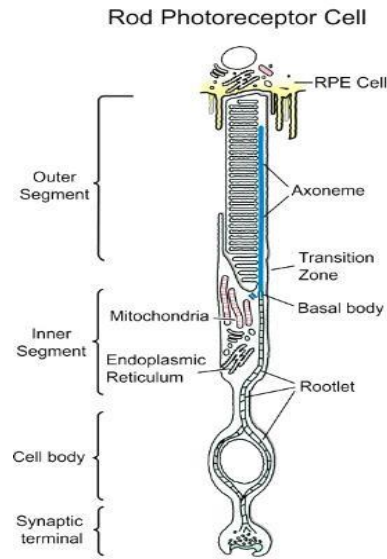
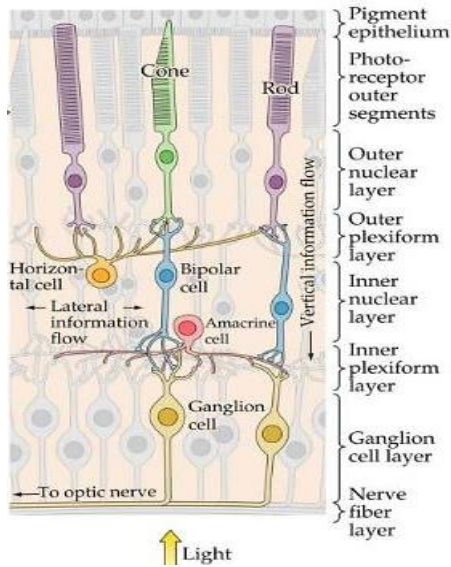
(右圖圖片來源：Physical Chemistry Chemical Physics [http://pubs.rsc.org/en/content/article/landing/2009/cp/b905454e/unauth#div Abstract](http://pubs.rsc.org/en/content/article/landing/2009/cp/b905454e/unauth#divAbstract))

(4) 感光細胞：

光進入眼睛後，由感光細胞接收光源在大腦轉換成視覺影像。感光細胞分為錐狀細胞 (Cone)、桿狀細胞 (Rod) 兩種。錐狀細胞 (Cone) 主要分布於黃斑部中央 (central fovea) 及中央小凹 (foveola)。錐狀細胞 (Cone) 負責色彩視覺。桿狀細胞 (Rod) 位於周邊視網膜，與暗視覺有關。外核層 (Outer Nucleus Layer - ONL) 包含錐狀細胞 (Cone) 與桿狀細胞 (Rod) 細胞核。(38,39,40,41)



(圖片來源：R Vision http://www.rci.rutgers.edu/~uzwiak/AnatPhys/Sensory_Systems.html)



(左圖來源： R Vision http://www.rci.rutgers.edu/~uzwiak/AnatPhys/Sensory_Systems.html)

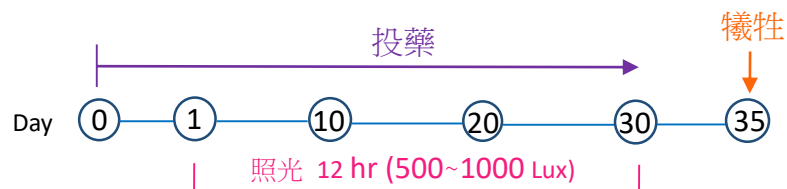
(右圖來源：http://www.cosmic-mindreach.com/Gene_Expression.html)

四、研究方法與步驟：

1. 實驗材料：

- (1) ICR 品系小鼠
- (2) 億光 11W LED 燈
- (3) 番紅花(Saffron)活性成分
- (4) 餵食針
- (5) 計時器
- (6) HE 染色材料
- (7) 顯微鏡

2. 實驗流程：



3. 動物實驗組別：

本實驗採取 ICR 小鼠，給予正常飲水及飼料，分實驗組與對照組共四組，實驗流程如下：

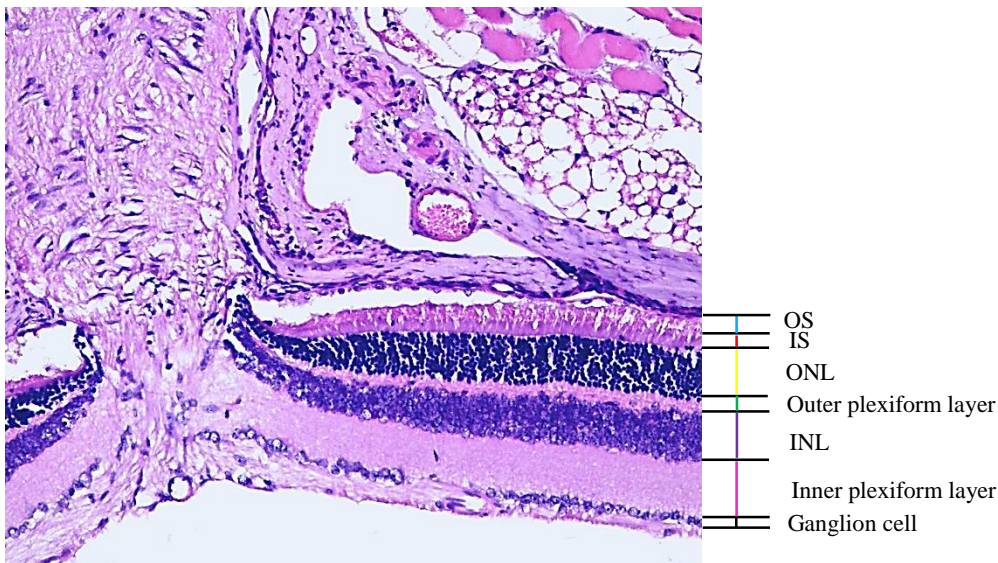
- (1) 空白對照組 (Blank)：在正常環境下，給予動物房標準光照，Day35 犧牲後進行 HE 染色，使用實驗室定量系統繪製視網膜組織地形圖及視網膜組織分析與視力值相關性。
- (2) 照光組 (LED 500~1000 Lux 12 hr)：Day 1~Day 30 早上 8:00~晚上 8:00 連續給予 LED 光照 12 hr。Day35 犧牲後進行 HE 染色，使用實驗室定量系統繪製視網膜組織地形圖。
- (3) 照光及番紅花活性成分組(SAE)：Day 1~Day 30 早上 8:00~晚上 8:00 連續給予 LED 光照 12 hr，實驗期間餵食番紅花活性成分。Day35 犧牲後進行 HE 染色，使用實驗室定量系統繪製視網膜組織地形圖。

4. HE 染色：

小鼠於 Day35 犧牲後進行組織染色處理，透過 HE 染色可以觀察視網膜各層組織型態的變化。

5. 視網膜組織地形圖：

HE 染色後使用實驗室定量系統繪製視網膜組織地形圖，分析視網膜各層厚度。



五、結果與討論：

1. HE 組織染色分析：

根據實驗結果，ONL 及 OS/IS 厚度及疏密度可以明顯看出，空白對照組 (Blank) 及餵食番紅花活性成分組 (LED+SAE) 厚度及密度較接近，但 LED 光傷害組 ONL 層和 OS/IS 層受到短波長 LED 光損傷，有變薄的趨勢厚度也明顯降低 (如圖 A.B)。根據實驗結果推測番紅花活性成分 (SAE) 對於長期照射 LED 的小鼠視網膜 (retina) 有保護作用。與前期追蹤小鼠視力值實驗有一致的趨勢。

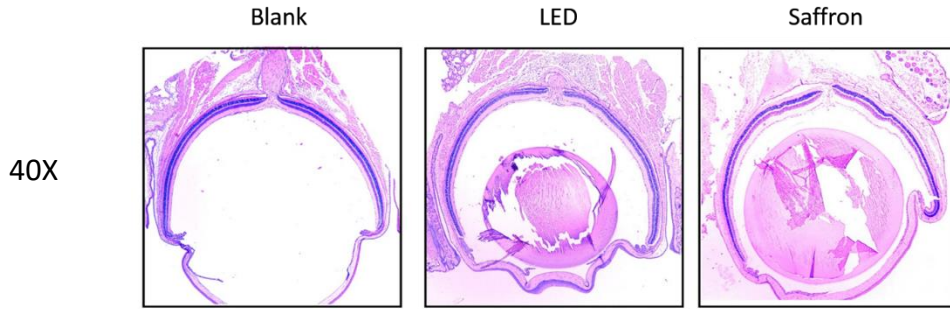


圖 A

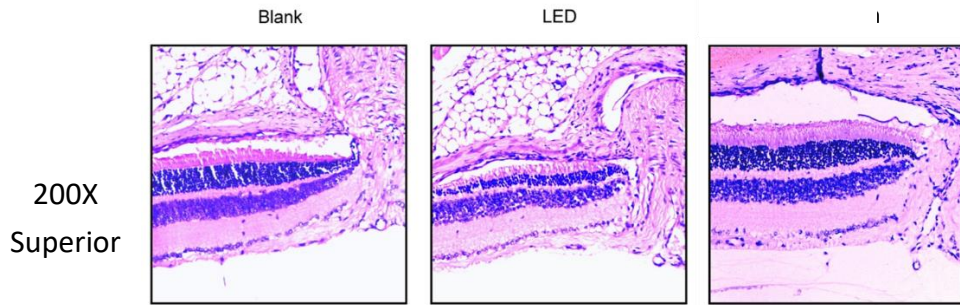
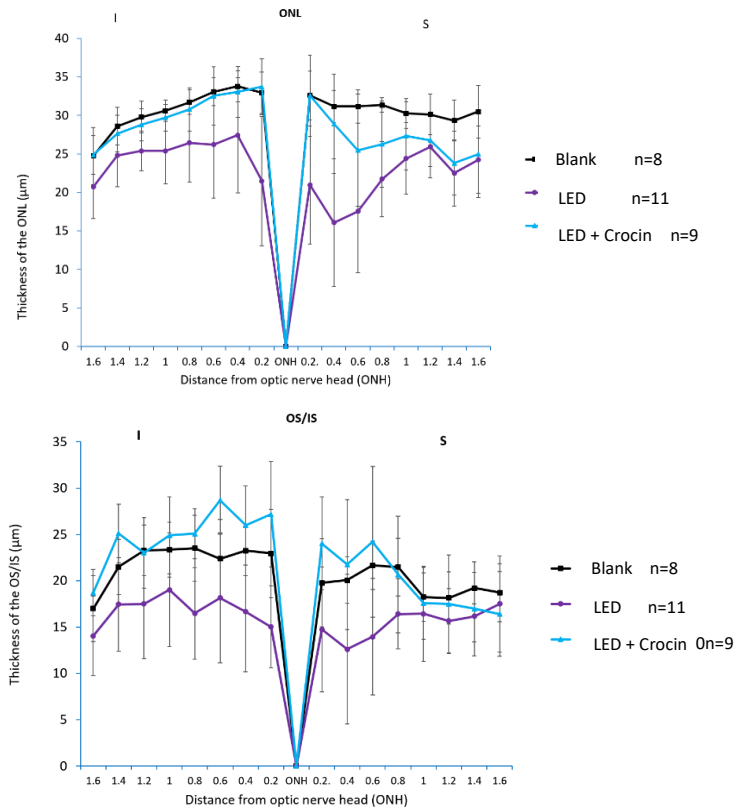


圖 B

2. 視網膜組織地形圖：

HE 染色後使用實驗室定量系統，對於 ONL 及 OS/IS 層分別繪製視網膜組織地形圖。從圖 C.D 可以看出空白對照組(Blank)及餵食番紅花活性成分組(LED+SAE)在 ONL 及 OS/IS 層厚度皆高於 LED 光傷害組，根據實驗結果推測番紅花活性成分(SAE)對於長期照射 LED 的小鼠視網膜(retina)有保護作用。



五、結論：

- (1) 前期實驗透過功能性測試，餵食番紅花活性成分能有效預防 LED 對眼睛造成的傷害。本次實驗進行組織病理性定量分析，顯示相似的實驗結果，光損傷會造成小鼠視網膜組織結構的損傷，但若在 LED 光照射的過程中餵食番紅花活性成分能有效保護視網膜組織結構的完整性。
- (2) 文獻指出番紅花活性成分主要經由腸道吸收，但微量 trans-crocetin 能以穩定速度通過腦血管屏障(BBB)到達中樞神經系統(CNS)。

根據實驗結果，透過功能性及組織病理性分析，在高能量光線曝曬下番紅花活性成分，能有效維持小鼠視覺功能及視網膜組織。但番紅花活性成分在視網膜保護上的機轉在未來會進一步研究。

六、致謝：

本次實驗中山醫大學視光學系 陳伯易老師實驗室與中山醫學大學附設醫院眼科劉智誠主治醫師共同指導整合。由老師和醫師臨床上經驗，提供仍在學習的我們一些患者的需求及不同的保健思考方向，未來在退化性視網膜疾病上，日常攝取保健相關的食品希望為患者帶來更好的效果。

七、參考文獻：

- (1.)資料來源：東曜 LED 科技股份有限公司 http://www.dytc.com.tw/hot_cg4452.html
- (2.)資料來源：<http://www.rohm.com.cn/web/china/led-lighting/lecture/led2>
- (3.)Effects of blue light on the circadian system and eye physiology 作者群：Gianluca Tosini,¹ Ian Ferguson,² Kazuo Tsubota³)
- (4.) Yoshiki Kuse, Kenjiro Ogawa, Kazuhiro Tsuruma, Masamitsu Shimazawa, and Hideaki Hara,(2014),Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light)
- (5.)資料來源：[http://glaucoma2014.pixnet.net/blog/post/256401718-%E7%95%AA%E7%B4%85%E8%8A%B1\(%E8%97%8F%E7%B4%85%E8%8A%B1\)%E4%BF%9D%E8%AD%B7%E8%A6%96%E7%A5%9E%E7%B6%93%E7%9A%84%E5%8A%9F%E6%95%88](http://glaucoma2014.pixnet.net/blog/post/256401718-%E7%95%AA%E7%B4%85%E8%8A%B1(%E8%97%8F%E7%B4%85%E8%8A%B1)%E4%BF%9D%E8%AD%B7%E8%A6%96%E7%A5%9E%E7%B6%93%E7%9A%84%E5%8A%9F%E6%95%88)
- (6.)資料來源：MrE. <http://eric-soilwater.blogspot.tw/2013/01/blog-post.html>
- (7.)資料來源：<http://www.leffingwell.com/saffron.htm>
- (8.)資料來源：<http://www.nricm.edu.tw/files/13-1000-5146.php>
- (9.)資料來源：Saeed Samarghandian,¹ Mohsen Azimi-Nezhad,^{1,2} Abasalt Borji¹ and Tahereh Farkhondeh³,(2016),Effect of crocin on aged rat kidney through inhibition of oxidative stress and proinflammatory state)
- (10.)資料來源：Irandokht Nikbakht-Jama,¹ Mohammad-Matin Khademib,¹ Mina Nosratia , Saeid Eslemic , Mojtaba Foroutan-Tanhac , Amir-Hossein Sahebkar , Shima Tavalalaiea , Majid Ghayour-Mobarhana,^d Gordon A.A. Fernse , Farzin Hadizadehf , Seyed-Abolghasem Sajjadi Tabasig , Seyed-Ahmad Mohajerig , Marzieh Emamiana,(2016),Effect of crocin extracted from saffron on pro-oxidant–anti-oxidant balance in subjects with metabolic syndrome: A randomized, placebo-controlled clinical trial)

- (11.) 資料來源：Serrano-Díaz J¹, Sánchez AM, Maggi L, Martínez-Tomé M, García-Diz L, Murcia MA, Alonso GL,(2012),Increasing the Applications of Crocus sativus Flowers as Natural Antioxidants)
- (12.) 資料來源：Marzyeh Kamyar ¹, Bibi Marjan Razavi ², Faezeh Vahdati Hasani ¹, Soghra Mehri ³, Amir Foroutanfar ¹, Hossein Hosseinzadeh ³,(2016),Crocine prevents haloperidol-induced orofacial dyskinesia: possible an antioxidant mechanism)
- (13.) 資料來源：Boskabady MH¹, Farkhondeh T¹,(2016),Antiinflammatory, Antioxidant, and Immunomodulatory Effects of Crocus sativus L. and its Main Constituents)
- (14.) 資料來源：Serdar Oruc ^a, Yücel Gönül ^b, Kamil Tunay ^c, Oya Akpınar Oruc ^c, Mehmet Fatih Bozkurt ^d, Ergün Karavelioğlu ^e, Erman Bağcıoğlu ^f, Kerem Senol Coşkun ^f, Sefa Celik ^g,(2016),The antioxidant and antiapoptotic effects of crocin pretreatment on global cerebral ischemia reperfusion injury induced by four vessels occlusion in rats)
- (15.) 資料來源：Esposito E1, Drechsler M2, Mariani P3, Panico AM4, Cardile V5, Crasci L4, Carducci F3, Graziano AC5, Cortesi R6, Puglia C4, (2017), Nanostructured lipid dispersions for topical administration of crocin, a potent antioxidant from saffron (Crocus sativus L).
- (16.) 資料來源：Ansari FA¹, Ali SN¹, Mahmood R¹, (2016), Crocin protects human erythrocytes from nitrite-induced methemoglobin formation and oxidative damage)
- (17.) 資料來源：KANG LI, YAN LI, ZHENJIANG MA and JIE ZHAO,(2015),Crocine exerts anti-inflammatory and anti-catabolic effects on rat intervertebral discs by suppressing the activation of JNK)
- (18.) 資料來源：Lei Song^{a,b} Chen Kang^{a,c} Yuan Sun^{a,d} Wenrui Huang^{a,b} Wei Liu^{b,e} Zhiyu Qian^a,(2016), Crocetin Inhibits LipopolysaccharideInduced Inflammatory Response in Human Umbilical Vein Endothelial Cells
- (19.) 資料來源：Fabiana Di Marco¹, Stefania Romeo¹, Charith Nandasena², Sivaraman Purushothuman², Charean Adams²,Silvia Bisti¹, Jonathan Stone²,(2013),The time course of action of two neuroprotectants,dietary saffron and photobiomodulation, assessed inthe rat retina)
- (20.) 資料來源：Fumiya Ishizuka ^a, Masamitsu Shimazawa ^a, Naofumi Umigai ^b, Hiromi Ogishima ^a, Shinsuke Nakamura ^a, Kazuhiro Tsuruma ^a, Hideaki Hara ^{a,n},(2013),Crocetin, a carotenoid derivative, inhibits retinal ischemic damage in mice)
- (21.) 資料來源：Yun Qi ^{a,b,1}, Li Chen ^{a,c,1}, Lei Zhang ^d, Wen-Bo Liu ^d, Xiao-Yan Chen ^d, Xin-Guang Yang ^{a,b},(2013),Crocine prevents retinal ischaemia/reperfusion injury-induced apoptosis in retinal ganglion cells through the PI3K/AKT signalling pathway)
- (22.) 資料來源：Yuta Ohno ^a, Tomohiro Nakanishi ^a, Naofumi Umigai ^b, Kazuhiro Tsuruma ^a, Masamitsu Shimazawa ^a, Hideaki Hara ^{a,n},(2012), Oral administration of crocetin prevents inner retinal damage induced by N-methyl-D-aspartate in mice)
- (23.) 資料來源：Rita Maccarone,¹ Stefano Di Marco,¹ and Silvia Bisti^{1,2,3},(2008),Saffron Supplement Maintains Morphology and Function after Exposure to Damaging Light in Mammalian Retina)
- (24.) 資料來源：Rita Maccarone¹, Cinzia Rapino², Darin Zerti¹, Monia di Tommaso², Natalia Battista³, Stefano Di Marco¹, Silvia Bisti^{1,4,5}, Mauro Maccarrone^{6,7},(2016), Modulation of Type-1 and Type-2 Cannabinoid Receptors by Saffron in a Rat Model of Retinal Neurodegeneration)
- (25.) 資料來源：Chen L1, Qi Y, Yang X, (2015), Neuroprotective effects of crocin against oxidative stress induced by ischemia/reperfusion injury in rat retina.
- (26.) 資料來源：Jie Zheng ¹, Yue Zhou ¹, Ya Li ¹, Dong-Ping Xu ¹, Sha Li ² and Hua-Bin Li ^{1,3},(2016),Spices for Prevention and Treatment of Cancers)

- (28.)資料來源：Xia D , (2015) , Ovarian cancer HO-8910 cell apoptosis induced by crocin in vitro)
- (29.)資料來源：Liu J^{1,2,3}, Mu J^{1,2,3}, Zheng C^{2,3}, Chen X^{2,3}, Guo Z^{2,3}, Huang C^{2,3}, Fu Y^{2,3}, Tian G⁴, Shang H⁴, Wang Y^{2,3} , (2016) , Systems-Pharmacology Dissection of Traditional Chinese Medicine Compound Saffron Formula Reveals Multi-scale Treatment Strategy for Cardiovascular Diseases)
- (30.)資料來源：Chahine N, Makhlof H, Duca L, Martiny L, Chahine R , (2014) , Cardioprotective effect of saffron extracts against acute doxorubicin toxicity in isolated rabbit hearts submitted to ischemia-reperfusion injury)
- (31.)資料來源：Amin A¹, Hamza AA, Daoud S, Khazanehdari K, Hrout AA, Baig B, Chaiboonchoe A, Adrian TE, Zaki N, Salehi-Ashtiani K , (2016) , Saffron-Based Crocin Prevents Early Lesions of Liver Cancer: In vivo, In vitro and Network Analyses)
- (32.)資料來源：Mahmoudzadeh L¹, Najafi H¹, Changizi Ashtiyani S², Mohamadi Yarijani Z¹ , (2016) , Anti-inflammatory and protective effects of saffron extract in ischaemia-reperfusion induced acute kidney injury.
- (33.)資料來源：Rajaei Z^{1,2}, Hosseini M¹ , Alaei H³,(2016),Effects of crocin on brain oxidative damage and aversive memory in a 6-OHDA model of Parkinson's disease)
- (34.)參考資料：維基百科 <https://zh.wikipedia.org/wiki/%E8%91%89%E9%BB%83%E7%B4%A0>)
- (35.)參考資料：維基百科 <https://zh.wikipedia.org/wiki/%E7%95%AA%E7%B4%85%E8%8A%B1>)
- (36.)資料來源：MrE. <http://eric-soilwater.blogspot.tw/2013/01/blog-post.html>)
- (37.)資料來源：Dr. Eye Chen Oline <http://www.dreye.net.tw/article/view/51>)
- (38.)資料來源：<http://doctor.get.com.tw/Learning/base-class/23.aspx>)
- (39.)資料來源：iovs an ARVO journal – investigative ophthalmology & visual science
Thomas Yorio, PhD - Editor-in-Chief 、 Molly Fujimoto - Director of Journals 、 Debbie Chin - Journals Manager 、 Kiyah Morrison - Editorial Coordinator)
- (40.)資料來源：M. Lautenschläger ^a , J. Sendker ^a , S. Hüwel ^b , H.J. Galla ^{b,5}, Brandt ^a , M. Düfer ^c , K. Riehemann, A. Hensel ^a,(2015), Intestinal formation of trans-crocetin from saffron extract (*Crocus sativus* L.) and in vitro permeation through intestinal and blood brain barrier)
- (41.)資料來源：Zhang X¹, Fan Z², Jin T¹, (2017) , Crocin protects against cerebral- ischemia-induced damage in aged rats through maintaining the integrity of blood-brain barrier)