

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計畫 : 護眼驗證分析：探討丹參生物活性分子用於減輕視網 \*  
\* 名稱 膜炎性損傷之藥效作用 \*  
\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 歐綺家  
學生計畫編號： MOST 106-2813-C-040-025-B  
研究期間： 106年07月01日至107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 107年02月08日

# 護眼驗證分析：探討丹參生物活性分子用於減輕視網膜炎性損傷之藥效作用

## Verification Analysis: Study the pharmacological efficacy of danshen bioactive ingredient for attenuating the retinal inflammatory injury

學生：歐綺家 (Chi-Chia Ou)

指導教授：陳伯易 (Bo-Yie Chen) 副教授

### 壹、摘要：

視網膜發炎損傷是高齡視覺退化問題的病因，老年性黃斑部病變(Age-related macular degeneration, AMD)、糖尿病視網膜病變(Diabetic retinopathy, DR)及黃斑部水腫(Macular edema, ME)與視網膜發炎損傷有高度的病理相關性。視網膜光損傷會啟動視網膜組織的發炎反應，刺激微膠細胞(microglia)的活化表現與發炎反應，使異常活化的微膠細胞改變細胞型態並釋放發炎因子，干擾米勒氏細胞及視網膜色素上皮的調節，並破壞血液視網膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)的通透性，造成免疫細胞的浸潤，進而加速視網膜組織的退化。若能早期阻斷視網膜發炎反應及其後續發炎浸潤的問題，可延緩高齡視覺退化的發展，避免視覺功能快速損傷。視網膜作為中樞神經系統的一部分，具有非常有限的再生能力，一旦其受損後會加速不可逆的傷害，因此早期的治療與視網膜損傷的防治是可行的方案。本研究使用小鼠視網膜光損傷模式，核心目標為驗證丹參水溶性活性分子(SAS)對於微膠細胞(microglia)活化的抑制作用，以及探討相關視網膜組織發炎損傷過程的藥理抑制功效。本實驗使用 ICR 小鼠，實驗設計分別為正常的空白對照組(Blank control group)、LED 光誘導視覺損傷組(LED group)、LED 光照並服用藥物丹參水溶性活性分子(SAS)預防組(LED+SAS)，為期 40 天。探討在 LED 照明誘導視網膜光損傷後，口服丹參水溶性活性分子(SAS)是否有預防視網膜發炎的效果。實驗分析採取 IHC 染色方法，以 Iba-1 抗體量化分析微膠細胞(microglia)的活化表現與視網膜的損傷表現。本研究結果說明在小鼠模式下尚未有明確生物證據關於口服丹參水溶性活性分子(SAS)可以減少高能量可見光(LED light)循環刺激所誘導的視網膜微膠細胞(microglia)異常發炎性活化表現。

**關鍵字：**護眼保健、丹參水溶性活性分子、視網膜發炎、視網膜光損傷、血液視網膜屏障

### 貳、研究動機與研究問題：

#### 一、研究動機

- (1) 視網膜再生能力有限，一旦受損會加速不可逆的傷害。視網膜發炎損傷是高齡視覺退化問題的病因，本實驗以小鼠模式探討是否能在早期阻斷視網膜發炎反應及其後續發炎浸潤的問題，並延緩視覺功能快速損失的發展。
- (2) 發炎的微膠細胞會釋放一氧化氮(NO)和有害的細胞因子如 Vascular endothelial growth factor (VEGF)和 Tumor necrosis factor(TNF)<sup>(1)</sup>。文獻指出丹參素有降低一氧化氮(NO)的功能<sup>(2)</sup>。因此本實驗探討並驗證口服丹參水溶性活性分子(SAS)是否具有延緩視網膜發炎反應之效果。

## 二、研究探討的核心問題

- (1) 探討口服丹參水溶性活性分子(SAS)是否「阻斷」微膠細胞(microglia)活化性發炎損傷。以 IHC 染色方法量化評估。
- (2) 藉由分析各組間微膠細胞損傷表現。探討丹參水溶性活性分子(SAS)對於緩解視網膜發炎損傷的藥理效果。

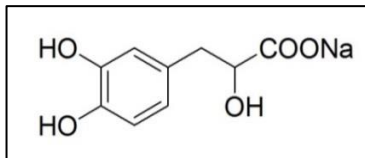
## 三、研究預期的貢獻

可提供生物證據關於丹參水溶性活性分子(SAS)對於護眼保健功效。

## 參、文獻回顧與探討：

### 一、丹參水溶性活性分子(SAS)：

化學式  $C_9H_9O_5Na$ ，水溶性，在自然界中不穩定，故把其做成鈉鹽，為酚性芳香酸類化合物，白色針狀結晶，來自唇形科植物丹參(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)和甘西鼠尾草的根<sup>(3)</sup>，功效和丹參素一樣，可溶於甲醇和水，不溶於氯仿、乙醚<sup>(4)</sup>。近年來研究指出丹參水溶性活性分子(SAS)具有預防心肌缺血損傷、抗癌、抗炎、擴張動脈、降血脂、活血化癥等功效。



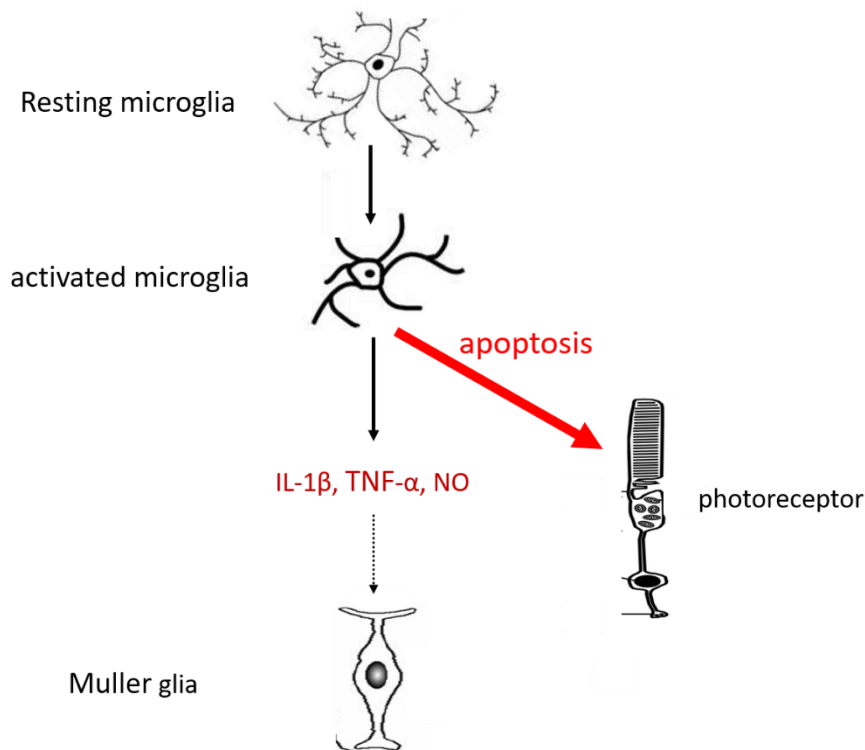
(圖片來源：<http://www.nature-standard.com/product/html/168.html>)



(圖片來源：<http://www.shuxigua.com/doc-view-90.html> 丹參)

### 二、微膠細胞(microglia)：

微膠細胞(microglia)是膠質細胞中最小的一種，於大腦和脊髓占所有的細胞比率約10-15%。當中樞神經系統損傷時，微膠細胞會改變其細胞型態，轉變為巨噬細胞吞噬細胞碎屑及退變的髓鞘。視網膜屬於中樞神經系統的一環，當視網膜受損時，活化的微膠細胞除了改變型態外，還會釋放大量的發炎因子(如  $IL-1\beta$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $NO$ )，這些發炎因子的累積使活化的微膠細胞會進一步與米勒氏細胞啟動信號傳導的程序(bidirectional microglia-Müller cell)，調節視網膜退化過程中感光細胞的存活<sup>(5)</sup>。

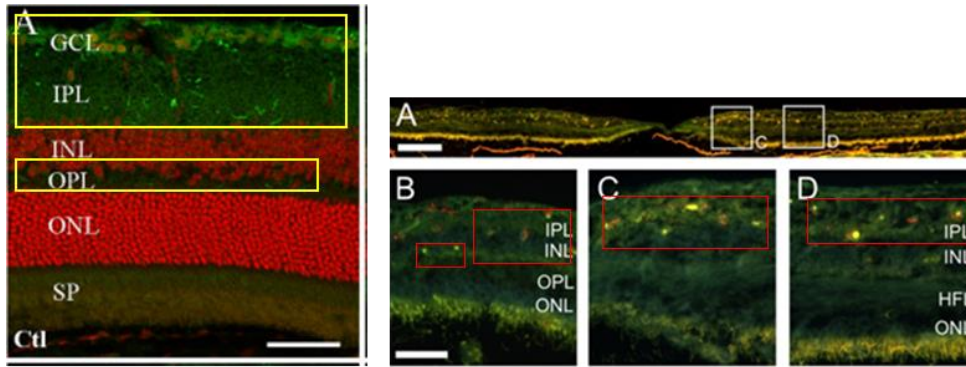


(圖片來源：參考 <http://www.jneurosci.org/content/22/21/9228>)

### 三、利用 Iba-1 抗體進行免疫組織化學染色(Immunohistochemistry stain):

Iba-1 (ionized calcium-binding adaptor molecule 1)，又稱 AIF-1 (allograft inflammatory factor 1)。該基因由細胞因子(cytokines)和干擾素(interferon)誘導，其蛋白質產物可能有助於在巨噬細胞激活中起作用。被用於檢查米勒氏細胞消融(ablation)後活化的微膠細胞。在中樞神經系統(CNS)中，Iba-1 抗體僅限於標定微膠細胞和巨噬細胞，因此可利用 Iba-1 抗體於視網膜內標定微膠細胞表現量。藉由比較微膠細胞的細胞形態、數量及分佈，來判定細胞活化狀態的變化。

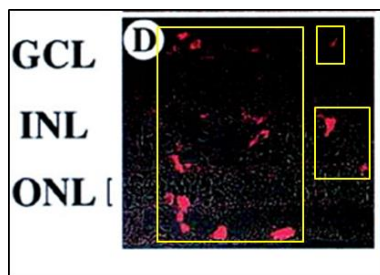
- (1) 健康的視網膜組織: 如下圖所示，主要在視網膜內部觀察到 Iba-1 免疫反應，例如神經節細胞層(Ganglion cell layer, GCL)、內網狀層(Inner plexiform layer, IPL)和內核層(Inner nuclear layer, INL)可觀察到未活化的微膠細胞，偶爾也出現在外網狀層(Outer plexiform layer, OPL)，在外核層(Outer nuclear layer, ONL)和感光細胞內外節部分(Outer segment, Inner segment, or Subretinal space)均未被發現。在染色中可看到這些未活化的微膠細胞體具有薄且細長的突起<sup>(13)</sup>。



(圖片來源：[https://static-content.springer.com/image/art%3A10.1186%2F1742-2094-10-137/MediaObjects/12974\\_2013\\_Article\\_1135\\_Fig4\\_HTML](https://static-content.springer.com/image/art%3A10.1186%2F1742-2094-10-137/MediaObjects/12974_2013_Article_1135_Fig4_HTML).)

(圖片來源：<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2974049/figure/F5/>)

- (2) 發炎退化的視網膜組織:如下圖所示,研究顯示視網膜退化(retinal degeneration)能將微膠細胞(microglia)從休眠轉變為活化狀態,使微膠細胞從內部遷移到外部視網膜,在 Iba-1 免疫染色下可看到微膠細胞從視網膜色素上皮(Retinal Pigment Epithelium,RPE)至外網狀層(Outer plexiform layer,OPL)都會產生訊號,同時可觀察到細胞體變大、細胞突起變厚,以增加接觸面積並加速細胞代謝進程(14)。

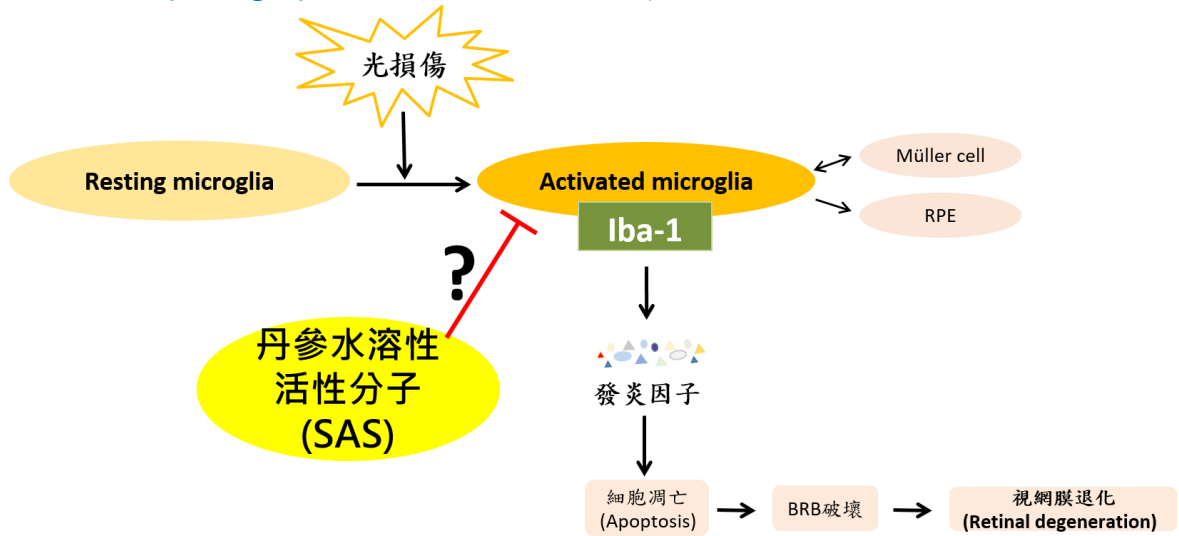


(圖片來源：[Microglia-Müller Glia Cell Interactions Control Neurotrophic Factor Production during Light-Induced Retinal Degeneration](#))

#### 四、LED 光損傷：

長期暴露於高強度光下,導致光誘導的視網膜損傷,除了視網膜感光細胞退化外,也會引起內部視網膜和神經節細胞死亡的退化性改變。近年來 LED(Light Emitting Diode)使用日益頻繁,與常規的家用光源相比,LED 向視網膜提供更高水平的高能量藍光,保護視網膜免受光損傷已是不容忽視的問題。本計畫使用光損傷動物模式的優點在於其所導致的感光細胞傷害及視網膜發炎損傷結果與人類眼科疾病具有病理相關性,例如老年性黃斑部病變、青光眼造成的視網膜組織細胞凋亡<sup>(30)</sup>。

## 五、微膠細胞(microglia)於光誘導視網膜炎性損傷下之相互作用：



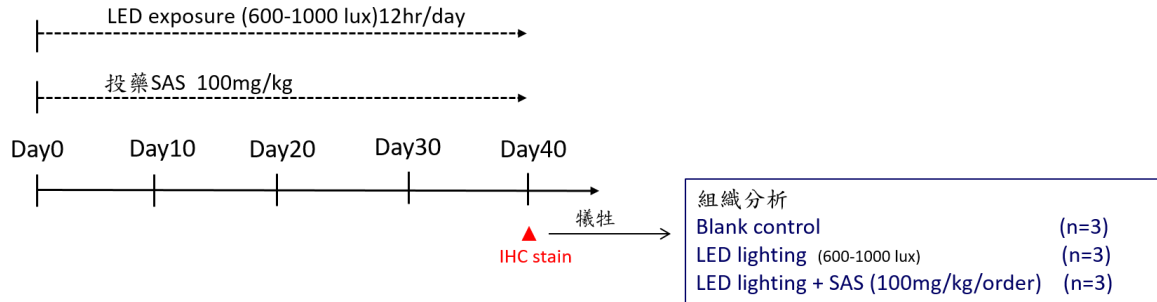
微膠細胞(microglia)為中樞神經系統免疫防禦的第一防線。在光誘導視網膜組織損傷下，會刺激微膠細胞的活化，使微膠細胞遷移至受損部位並改變其細胞型態。異常活化的微膠細胞可以調節米勒氏細胞及視網膜色素上皮之相互作用，並誘導多種發炎因子釋放，引起神經元損傷，進而破壞血液-視網膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)，導致視網膜退化(Retinal degeneration)，使視力發生不可逆的損害。微膠細胞的活化表現與發炎反應表現在 Iba-1 蛋白上，由此量化分析細胞損傷程度，評估丹參水溶性活性分子(SAS)抑制視網膜發炎的藥理效用。本實驗預期口服丹參水溶性活性分子(SAS)可以抑制視網膜微膠細胞活化表現，並預防視覺功能退化。

## 肆、研究方法與步驟：

### 一、實驗材料：

- (1) ICR 品系小鼠
- (2) 市售 9W LED 燈
- (3) 餵食針
- (4) 計時器
- (5) Iba-1 染色套組
- (6) 顯微影像擷取設備

### 二、實驗流程：



空白對照組(Blank control group)實驗期間在正常光照環境下生存。LED 光誘導視覺損傷組(LED group)進行持續 40 天 12/12 小時亮/暗循環 LED 光照。預防組進行持續 40 天 12/12 小時亮/暗循環 LED 光照並口服丹參水溶性活性分子(LED+ SAS group)，一次口服丹參水溶性活性分子(SAS)劑量 100mg/kg，一天兩次。實驗於 Day40 犧牲後進行 IHC 染色組織分析。

### 三、動物實驗組別：

本實驗採取 ICR 小鼠，給予正常飲水及飼料，分實驗組跟對照組共三組：

- (1) 空白對照組(Blank control group)：在正常光照下生活 40 天。
- (2) LED 光誘導視覺損傷組(LED group)：Day1~Day40 每天早上 8:00 到晚上 8:00 持續 LED 照光 12 小時，其餘時間不給任何照明。
- (3) LED 光照並口服丹參水溶性活性分子(SAS)預防組(LED+SAS group)：Day1~Day40 每天早上 8:00 到晚上 8:00 持續 LED 照光 12 小時，其餘時間不給任何照明。實驗期間一次口服丹參水溶性活性分子(SAS)劑量 100mg/kg，一天兩次。

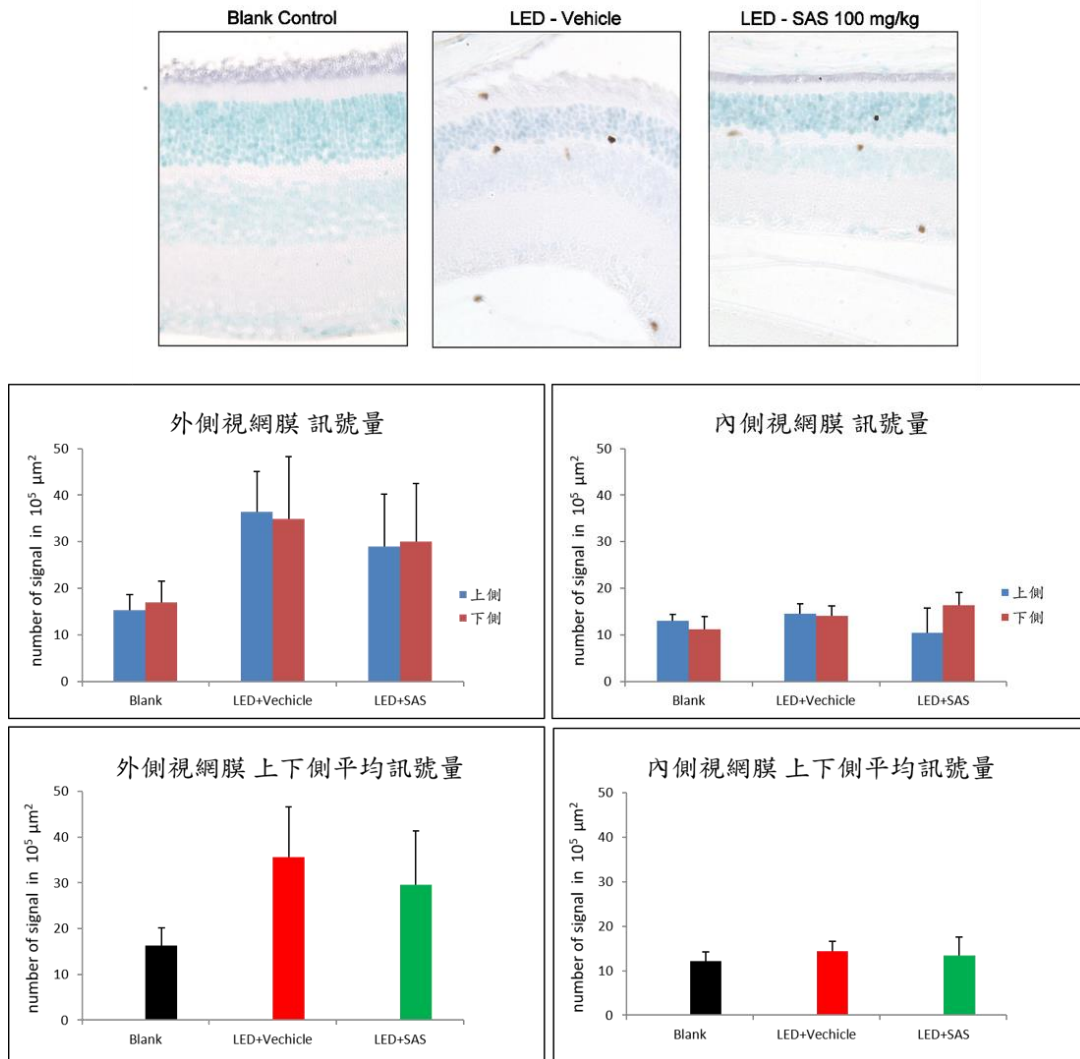
### 四、實驗數據分析點：

三組皆於 Day40 犧牲後進行 IHC 染色，藉此量化分析丹參水溶性活性分子(SAS)用於減輕視網膜炎性損傷之藥理作用。

### 伍、實驗結果與討論

1. 本研究所採取的定量標準是以視神經頭(Optic nerve head ,ONH)為標準將視網膜分成上下兩側，以視網膜外網狀層(Outer plexiform layer, OPL)為界線，往視網膜色素上皮細胞層(Retinal Pigment Epithelium, RPE)定義為外側視網膜，往神經節細胞層(Ganglion cell layer, GCL)定義為內側視網膜。將視網膜分成四個區塊，並計算視網膜於各區塊的訊號表現量。
2. 結果如下圖，在 LED 光誘導視網膜損傷模式平台下，比較空白對照組(Blank control group)及 LED 光誘導視覺損傷組(LED group)，兩組間於定性圖可觀察訊號表現量有明顯差異，進一步量化可發現於外側視網膜具有顯著性差異( $p=0.049$ )，推測此損傷平台能透過 Iba-1 蛋白標定微膠細胞的發炎活化表現。接著比較 LED 光誘導視覺損傷組(LED group)及 LED 光照並服用丹參水溶性活性分子預防組(LED+SAS group)，於定性圖上可觀察到口服丹參水溶性活性分子(SAS)趨勢上是有些微保護效果，量化後的數據圖表可發現 LED 光照並服用丹參水溶性活性分子預防組(LED+SAS group)相較

於 LED 光誘導視覺損傷組(LED group)的 Iba-1 訊號表現量較少，然而還無法明確定義丹參水溶性活性分子(SAS)用於抑制微膠細胞異常活化的趨勢。



3. 本計畫透過 Iba-1 蛋白指標探討微膠細胞活化表現，觀察到口服丹參水溶性活性分子(SAS)尚未有明確的生物證據用於減緩視網膜微膠細胞所介導的發炎性損傷。

## 陸、結論

由定性及定量數據分析顯示，本計畫採用 Iba-1 蛋白指標還無法明確定義丹參水溶性活性分子(SAS)用於抑制微膠細胞異常的活化。推測原因為實驗方法所採取之生物標記，如：Iba-1 未能突顯出其關鍵作用，或者是由於丹參水溶性活性分子(SAS)並不是透過抑制微膠細胞的發炎機轉達到藥理抑制功效。未來期望放大實驗規模與樣本數，並嘗試透過不同的生物指標，改變定量分析策略，繼續深入探討丹參水溶性活性分子(SAS)對於視網膜保護的機制，提供更多護眼保健相關之生物證據。



## 柒、參考文獻：

- (1) Giaume C1, Kirchoff F, Matute C, Reichenbach A, Verkhratsky A. **Cell Death Differ. Glia: The fulcrum of brain disease** 2007 Jul;14(7):1324-35. Epub 2007 Apr 13
- (2) Yang RX, Huang SY, Yan FF, Lu XT, Xing YF, Liu Y, Liu YF, Zhao YX. **Danshensu protects vascular endothelia in a rat model of hyperhomocysteinemia.** Acta Pharmacol Sin. 2010 Oct; 31(10): 1395–1400.
- (3) 製藥在線 <http://www.cphi.cn/Products/show-141862.html>
- (4) 華人百科 <https://www.itsfun.com.tw/%E4%B8%B9%E5%8F%83%E7%B4%A0%E9%88%89/wiki-5538907-5680886>
- (5) Shen W, Zhu L, Lee SR, Chung SH, Gillies MC. **Involvement of NT3 and P75(NTR) in photoreceptor degeneration following selective Müller cell ablation.** J Neuroinflammation. 2013 Nov 14;10:137.
- (6) Reichenbach A1, Bringmann A. **New functions of Müller cells.** Glia. 2013 May;61(5):651-78.
- (7) Skytt DM, Toft-Kehler AK, Brændstrup CT, Cejvanovic S, Gurubaran IS, Bergersen LH, Kolko M. **Glia-Neuron Interactions in the Retina Can Be Studied in Cocultures of Müller Cells and Retinal Ganglion Cells.** BioMed Research International Volume 2016 (2016), Article ID 1087647
- (8) Newman E, Reichenbach A. **The Müller cell: a functional element of the retina.** Trends Neurosci. 1996 Aug;19(8):307-12.
- (9) Otteson DC, Phillips MJ. **A Conditional Immortalized Mouse Müller Glial Cell Line Expressing Glial and Retinal Stem Cell Genes** Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Nov; 51(11): 5991–6000.
- (10) Holtkamp GM1, Kijlstra A, Peek R, de Vos AF. **Retinal pigment epithelium-immune system interactions: cytokine production and cytokine-induced changes.** Prog Retin Eye Res. 2001 Jan;20(1):29-48.
- (11) <http://www.abcam.com/iba1-antibody-ab5076.html>
- (12) <http://www.genetex.com/lba1-antibody-GTX100042.html>
- (13) Powner MB, Gillies MC, Tretiach M, Scott A, Guymer RH, Hageman GS, Fruttiger M. **Perifoveal Müller Cell Depletion in a Case of Macular Telangiectasia Type 2** Ophthalmology. 2010 Dec; 117(12): 2407–2416.
- (14) Harada T1, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K. **Microglia-Müller Glia Cell Interactions Control Neurotrophic Factor Production during Light-Induced Retinal Degeneration.** J Neurosci. 2002 Nov 1;22(21):9228-36
- (15) <http://library.ndmctsgh.edu.tw/ttsweb/piggy/ttsweb/Document/000001571/327008e/1-2.pdf>
- (16) Zhang N Zou H , Jin L , Wang J , Zhong MF , Huang P , Gu BQ , Mao SL , Zhang C ,Chen H. **Biphasic effects of sodium danshensu on vessel function in isolated rat aorta.** Acta Pharmacol Sin. 2010 Apr;31(4): 421-428
- (17) Guo C , Yin Y , Duan J , Zhu Y , Yan J , Wei G , Guan Y , Wu X , Wang Y , Xi M , Wen A. **Lactic acid from Radix and Rhizoma Salviae miltiorrhizae = Danshen against cerebral ischemia and reperfusion injury in rats.** Phytomedicine 2015 Feb 15;22(2):283-9.
- (18) 丹參健康世界 <http://austinlin2010.blogspot.tw/>
- (19) Y Shen , J Luan , S Zhang , SD Wang , C Zhang , JC Wan. **Effect of Sodium Danshensu on Oxygen Consumption in Anesthetized Dog** 藥學實踐雜誌, 28 卷 6 期 (2010/11/30), P440 --444
- (20) YW Zhao, WL Xie, WJ Sun, B Liu. **Effects of Danshensu on sodium current in isolated ventricular cells in guinea-pig** 《Acta Academiae Medicinae Cpaif》 2005-04
- (21) Iandiev I ,Wurm A ,Hollborn M , Wiedemann P ,Grimm C ,Remé CE ,Reichenbach A ,Pannicke T ,Bringmann A. **Müller Cell Response to Blue Light Injury of the Rat Retina** Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 Aug;49(8):3559-67.
- (22) Reichenbach A1 ,Wurm A ,Pannicke T ,Iandiev I ,Wiedemann P ,Bringmann A. **Müller cells as players in retinal degeneration and edema.** Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2007 May;245(5):627-36. Epub 2007 Jan 12
- (23) Daniel Goldman. **Müller glial cell reprogramming and retina regeneration** Nat Rev Neurosci. 2014 Jul; 15(7): 431–442.
- (24) Fischer AJ, Reh TA. **Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina.** Nat Neurosci. 2001 Mar;4(3):247-52.
- (25) Wan J,Zheng H,Chen ZL,Xiao HL,Shen ZJ,Zhou GM. **Preferential regeneration of photoreceptor from Müller glia after retinal degeneration in adult rat** Vision Res. 2008 Jan;48(2):223-34. Epub 2007 Dec 21.
- (26) Wang M1, Wong WT. **Microglia-Müller cell interactions in the retina.** Adv Exp Med Biol. 2014;801:333-8.
- (27) Wang M1 ,Ma W ,Zhao L ,Fariss RN ,Wong WT. **Adaptive Müller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina.** J Neuroinflammation. 2011 Dec 7;8:173.
- (28) Grigsby JG, Cardona SM, Pouw CE, Muniz A, Mendiola AS, Tsin AT, Allen DM, Cardona AE. **The Role of Microglia in Diabetic Retinopathy** J Ophthalmol. 2014;2014:705783

- (29) Wenxin Ma, Lian Zhao, Aurora M. Fontainhas, Robert N. Fariss, Wai T. Wong. **Microglia in the Mouse Retina Alter the Structure and Function of Retinal Pigmented Epithelial Cells: A Potential Cellular Interaction Relevant to AMD.** PLoS One 2009 Nov 20;4(11):e7945. Epub 2009 Nov 20.
- (30) Ramirez AI<sup>1,2</sup>, de Hoz R<sup>1,2</sup>, Salobar-García E<sup>1,3</sup>, Salazar JJ<sup>1,2</sup>, Rojas B<sup>1,3</sup>, Ajoy D<sup>1</sup>, López-Cuenca I<sup>1</sup>, Rojas P<sup>1,4</sup>, Triviño A<sup>1,3</sup>, Ramírez JM. **The Role of Microglia in Retinal Neurodegeneration: Alzheimer's Disease, Parkinson, and Glaucoma.** Front Aging Neurosci. 2017 Jul 6;9:214. doi: 10.3389/fnagi.2017.00214. eCollection 2017.