

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 研究黃耆苷活性成分在預防視網膜光損傷中的作用
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 王聖喬
學生計畫編號： MOST 106-2813-C-040-023-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： 劉智誠

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

中華民國 107年02月10日

研究黃耆苷活性成分在預防視網膜光損傷中的作用

Study the Effect of Astragaloside Active Ingredient in Preventing Photodamage on Retina

學生：王聖喬 (Sheng-Chiao-Wang)

指導教授：劉智誠 醫師 (Jym-cheng, Liou)

一、摘要

視網膜光損傷老化的預防是目前高齡視覺保健中非常重要的課題。而高能量可見光譜(例如 LED 中的藍光)所引起慢性或急性視網膜光損傷，更會加速老年性黃斑部退化(AMD)、糖尿病視網膜損傷(DR)、青光眼(Glaucoma)患者族群的視覺退化。黃耆是傳統保健常用的中草藥素材，具有抗發炎、抗氧化以及神經保護的功效。目前已經有研究表明黃耆活性萃取物可以減緩糖尿病小鼠的視網膜神經節細胞(ganglion cell)損傷及退化，不過對感光細胞(photoreceptor)的保護效果還沒有明確的生物證據可以支持。高能量可見光對視網膜感光細胞(photoreceptor)的傷害主要來自於自由基所造成的感光細胞外節與內節(OS/IS)結構的退化(老化)。本次實驗目的為探討黃耆苷活性分子(Asg)是否可以預防視網膜感光細胞(photoreceptor)的損傷。以 ICR 小鼠實驗模式驗證，利用組織分析與視網膜地形圖分析方法，量化並評估視網膜感光細胞層(ONL)、感光細胞外節(OS)與感光細胞內節(IS)層的生理狀況。比較(1)空白對照組; (2) LED 光照+ Vehicle 組; (3) LED 光照+ Asg 組。實驗設計總天數為 21 天。這次研究結果預期能夠提供有效的生物驗證數據，關於黃耆苷活性分子用於視網膜感光細胞(photoreceptor)的保健效益。

關鍵字：黃耆苷活性分子、LED 高能量可見光、視網膜光化學損傷、感光細胞

二、研究動機與研究問題

- (1) 高齡視覺保健課題與視覺退化防治是當代被關注的課題。視網膜光損傷是造成視覺退化的原凶之一。藥用食品保健策略是防治視覺退化的主要方法，可彌補光學鏡片預防的不足。但藥用食品對於護眼保健的相關效果，乃需要生物驗證。
- (2) 黃耆苷活性分子(Asg)具抗氧化能力，近來亦有證據說明其神經保護功效，推測可作為預防視網膜光損傷的中草藥萃取物，並具有相當的發展潛力。本次實驗以高藍光 LED 建構視網膜光損傷小鼠模型，並比較投藥組及非投藥組的細胞損傷情形，藉以探討黃耆苷活性分子(Asg)對感光細胞之保健效果。

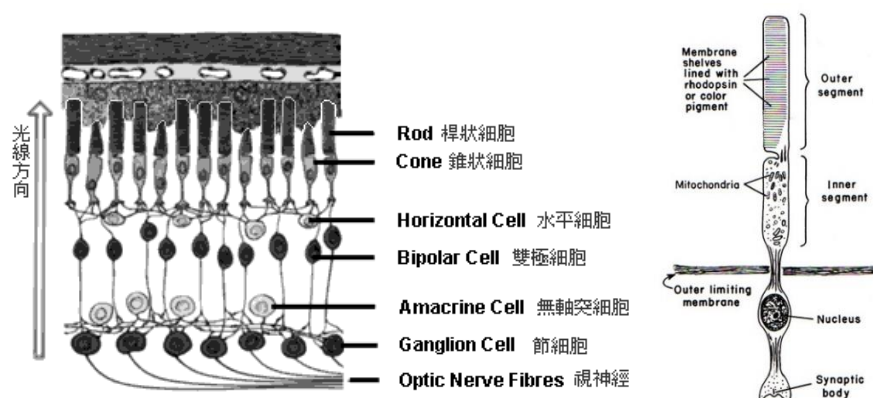
三、研究預期可解決的問題

- (1) 提供黃耆苷活性分子對於預防視網膜光化學損傷的生物證據。
- (2) 提供證據關於黃耆苷活性分子用於視網膜感光細胞(photoreceptor)的保健效益。

四、文獻回顧與探討

(1) 感光細胞

光線進入眼睛到達視網膜後，感光細胞吸收光訊息並將它轉為電訊息開始一連串的神經傳導，最後到達大腦加工處理後產生我們看到的影像。感光細胞分成桿狀細胞(Rod cells)以及錐狀細胞(Cone cells)兩種。桿狀細胞(Rod cells)大部分分布於視網膜周邊，含有一種感光色素視紫質(Rhodopsin)對於光線較敏感主要負責暗視覺，不能分辨色彩；錐狀細胞(Cone cells)主要分布於黃斑部中央(central fovea)，其中又分為分別含有紅、綠、藍三種感光色素的細胞，能接收不同波長的光產生色彩視覺，在較亮的環境才能產生反應，主導亮視覺。感光細胞的結構分成四個部分：外節(Outer segment, OS)、內節(Inner segment, IS)、細胞核、突觸。Outer segment(OS)是色素分布的地方也是接收光訊息的地方，而 Inner segment(IS)中有很多的粒線體是提供整個感光細胞能量的地方。(1)

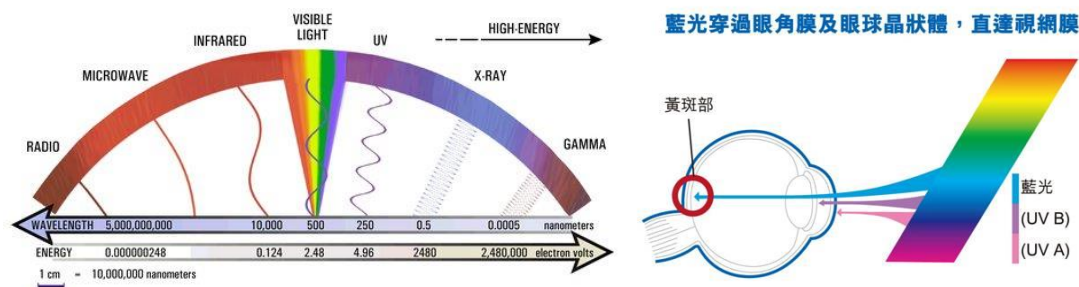


圖片來源(左)<http://www.yinlih.com/2008/11/2.html>

圖片來源(右)http://www.corpshumain.ca/en/Vue_en.php

(2) 藍光與光化學傷害

太陽光是由許多種不同波段的光組合而成，其中波長越大相對的能量就越低，波長越短能量就越高，對眼睛的傷害也越高。藍光指的就是波長 400~500nm 之間的可見光，雖然藍光的能量並沒有紫外光高，但藍光在角膜及水晶體的過濾效果並沒有 UVA、UVB 來的好，使得藍光在視網膜上成了主要的傷害來源。

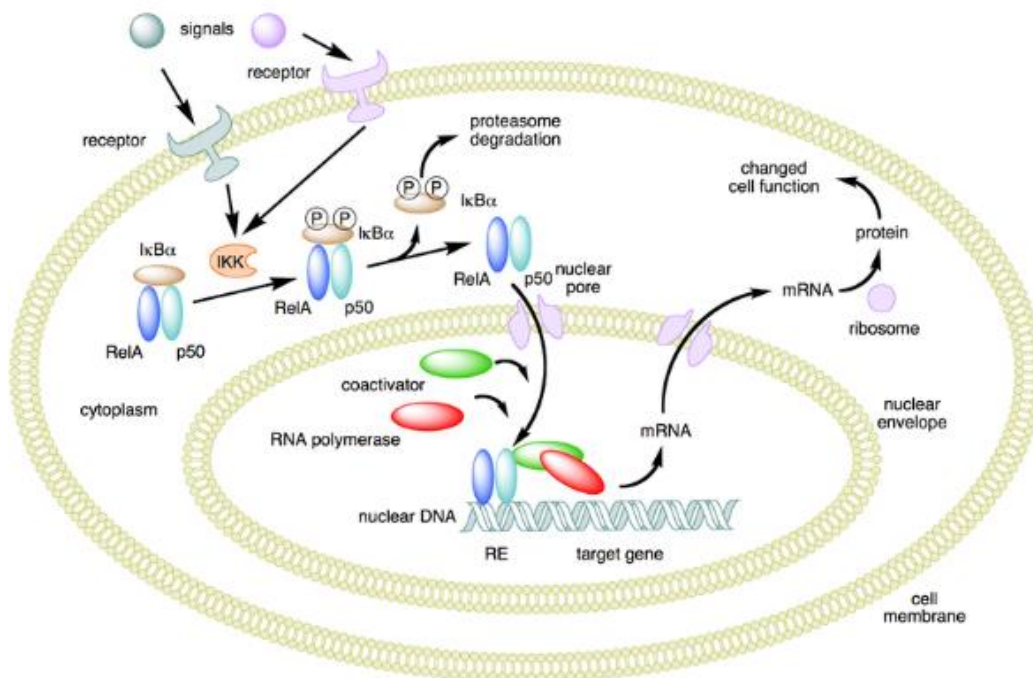


圖片來源 <http://www.mpe.mpg.de/437439/HighEnergy>

圖片來源 <https://www.soeyewear.com/Article/Detail/574>

自由基是一種不成對的分子(離子或原子)，當分子受到一定能量激發時，其中的化學鍵會被打斷發生化學反應，而在打斷的過程當中有些反應就會產生短暫的不成對電子也就是自由基。大部分的自由基因為不成對的電子而有極高的活性容易與附近的物質發生氧化反應。在視網膜中，當感光細胞接收光能量時會引起氧化反應，過程中會產生自由基，而感光細胞的 Outer segment(OS)也就是接收光線的部位含有很多的不飽和脂肪酸，自由基的產生使得這些脂肪酸過氧化進而造成視網膜的受損與老化。也有文獻指出長時間暴露在高能量的藍光下與自由基所牽動的整個視網膜光化學傷害有相關聯。(2)

另一方面 Wu T 等人(2002)在強光誘導小鼠視網膜光損傷中的感光細胞中以抗體定位 Nuclear factor- κ B(NF- κ B)，發現經過照射 NF- κ B 會向下進行特定的基因轉錄(3)。Nuclear factor- κ B(NF- κ B)是一種蛋白脂複合物，是轉錄因子的一種，存在於真核細胞的細胞質中，一般時候 I κ B 蛋白會接 NF- κ B 上並抑制其活性，當受到特定物質刺激時 I κ B 蛋白磷酸化並斷開與 NF- κ B 的結合，使 NF- κ B 活化並進入細胞核引起一些特定基因的轉錄，包括發炎反應與細胞凋亡。而這些特定的刺激物質就有前面所提到的自由基，若能有效的減少氧化壓力，可能可以減少這類光化學損傷中感光細胞的凋亡數量。(4)

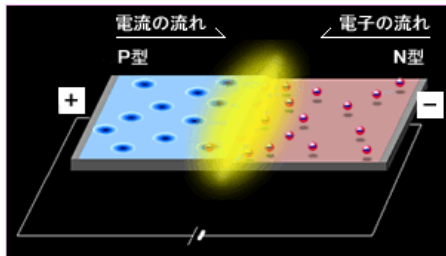


圖片來源 Wikipedia <https://en.wikipedia.org/wiki/NF-%CE%BAB>

除了破壞較輕微的部分能夠憑藉著視網膜自身的保護機制來復原，如果是長時間受到高能量的強光照射超過了保護機制所能復原的範圍勢必只能藉由外來的因子來保護網膜的神經細胞，例如抗氧化劑及神經保護相關的藥物。

(3) LED 建立的視網膜光傷害模型

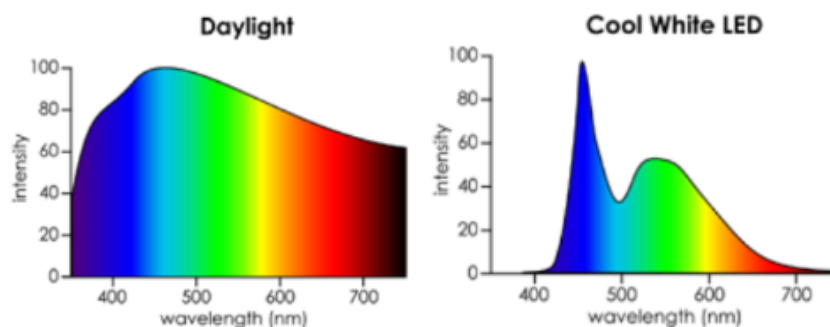
LED(發光二極體 Light Emitting Diode)，是一種利用半導體發光的技術，將電池的正極接在 P 型半導體上，將電池的負極接在 N 型半導體上，當高能電子與電洞結合，能量便轉換成光能發散出來，不同波長的光線則取決於二極體的金屬使用而有所不同。



圖片來源 LED-SHOP <http://www.led-shop.com.tw/page38.htm>

1990 年代，藍光 LED 被開發後⁽⁵⁾，隨之出現的便是最廣泛被利用的白光 LED。白光 LED 燈主要是利用藍光照射塗有黃色螢光物質的表面而發出白光⁽⁶⁾，若想要有較亮的光線則增加藍光的比例，若想要較溫和的光線可以減低藍光的比例。⁽⁷⁾

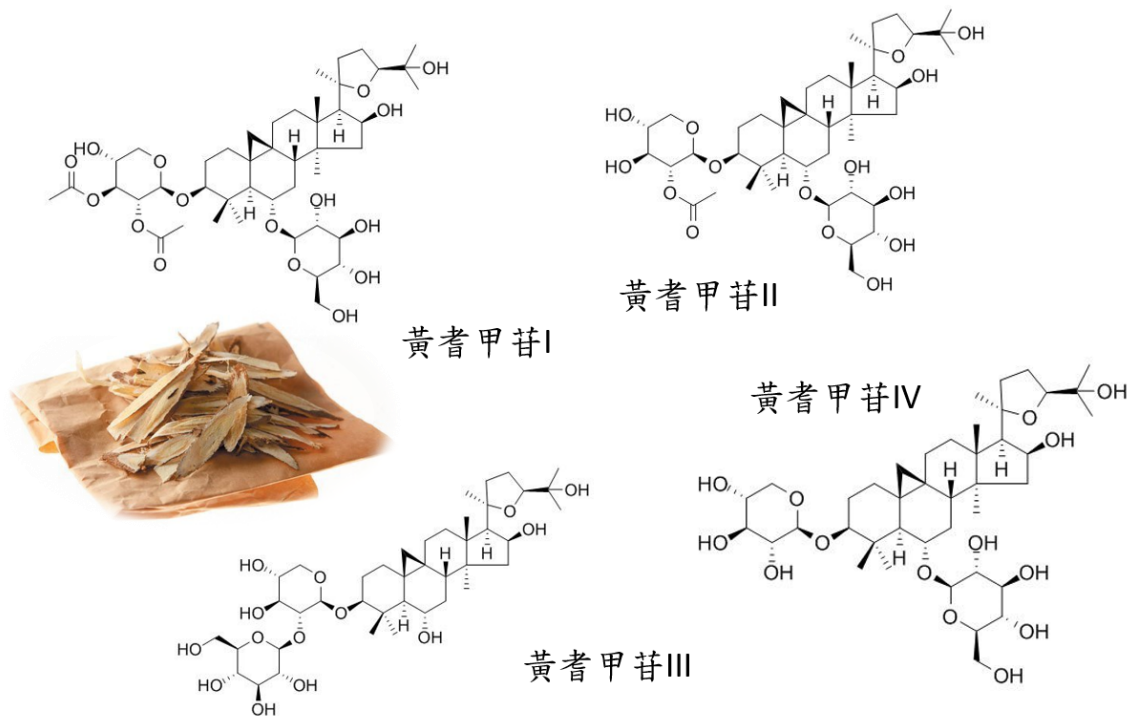
藍光在太陽光中的比例並沒有高出其他波段的很多，而在 LED 中藍光的比例是明顯高過於其他光線的，在上面的藍光與光化學傷害中有提到藍光對於視網膜的傷害是大於其他波長的光線，在相同照度的條件下，LED 比太陽光含有更高比例的藍光，可能對眼球組織造成更高的風險。又因為近年來 LED 背光面板的開發逐漸成熟與普及，日常生活中接觸以 LED 為光源的數位顯示產品的機會越來越多，也可能提高眼球組織的風險。



圖片來源 <http://light.lopezwinery.com/full-spectrum-led-light-bulbs-information/>

(4) 黃耆(Astragalus)

「當歸補血，黃耆補氣」黃耆是台灣近年來用量排名第一的中藥材，市售的黃耆是豆科植物膜莢黃耆或蒙古黃耆的乾燥根⁽⁸⁾，又可稱作綿耆、綿黃耆、北耆、東北黃耆、黑皮耆，產於中國北部黑龍江、內蒙古、遼寧一帶⁽⁹⁾，從中已分析出黃耆多醣類(astragalins)、黃耆苷類(astragalosides)、芒柄花素(formononetin)、毛蕊異黃酮(calycosin)、胺基酸…等多種化學成分，有補身補氣、抗疲勞、免疫調節作用以及利尿的功效。⁽¹⁰⁾



圖片來源 <https://health.udn.com/health/story/6037/351624>

圖片來源 ChemFace

黃耆苷類(astragalosides)，可溶於甲醇、乙醇等有機溶劑，是黃耆中的主要有效成分之一⁽¹¹⁾，提取物包含 Astragaloside I, Astragaloside II, Astragaloside III, Astragaloside IV⁽¹²⁾。許多研究發現其與抗氧化、抗發炎、抗細胞凋亡的 NF- κ B 機制有很大的關係，另外在神經保護方面也有研究指出與腦源性神經營養因子的製造有關。

(a) 抗氧化作用：

LEI Hong 等人在 2003 年進行了黃耆與抗氧化的關係，其中有一項比較是針對於 6 月齡小鼠及 17 月齡中年小鼠以及有餵藥的 17 月齡中年小鼠的運動及記憶功能以及胸腺指數，發現有投藥的小鼠與 6 月齡的小鼠功能指數較相近，結果證實黃耆的抗衰老作用。⁽¹³⁾

(b) 可以抑制 NF- κ B 機制(抗發炎、阻止細胞進行凋亡程序):

細菌內毒素(LPS)能夠誘導 NF- κ B 機制的活化，Wei-Jian Zhang 等人藉由餵食小鼠黃耆苷活性成分探討其是否可以抑制 LPS 所誘發的 NF- κ B 機制。數據表明黃耆苷類確實能抑制 NF- κ B 向下調節。⁽¹⁴⁾

(c) 保護神經元：

在低氧誘導海馬神經元損傷的實驗模式中，黃耆萃取物可以有效的減少神經元的凋亡。⁽¹²⁾

(d) 可促進 BDNF 作用：

2014 年孫麗等人曾在中国临床神经科学發表一篇文章，他們建構大腦缺血導致神經損傷的小鼠模式探討黃耆甲苷與神經滋養因子 BDNF、血管內皮生長因子 VEGF 以及血管內皮生長因子受體 VEGFR2 的表達，結果證實黃耆苷類可以使這三種蛋白增加達到抑制細胞凋亡以及受損神經的修復。⁽¹⁵⁾

(e) 可抑制糖尿病視網膜病變：

Yuzhi Ding 等人在糖尿病視網膜疾病的小鼠模式中發現透過黃耆苷類的作用，使得視網膜中神經節細胞 NF-κB 的機制被抑制。數據也表明了其對視網膜組織抗發炎以及網膜神經細胞的保護功效。⁽¹⁶⁾

四、研究方法與步驟

(1) 實驗材料：

1. ICR 品系老鼠
2. 市售 LED 燈
3. 曝光專用鏡箱
4. 黃耆苷活性分子(Asg)
5. 小鼠餵食器材
6. 計時器
7. HE 染劑
8. 顯微影像擷取系統

(2) 動物模型：

實驗使用 ICR 品系老鼠(皆使用母鼠)，分成對照及實驗組別共 3 組：

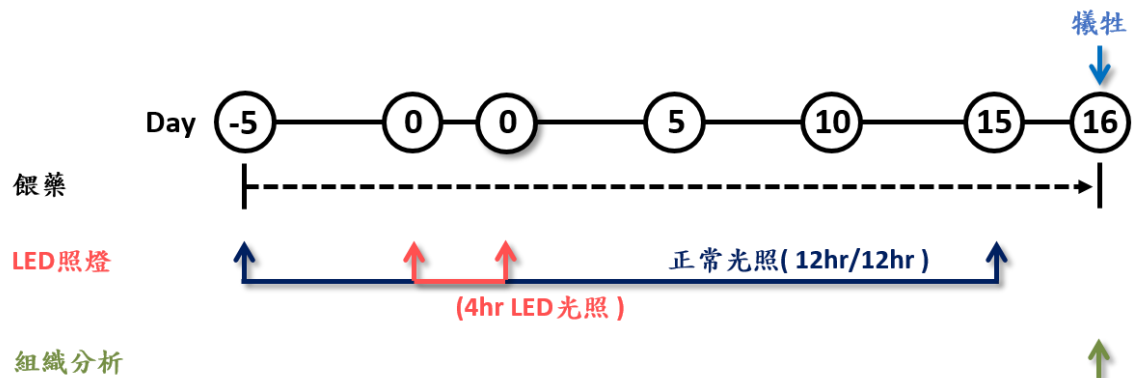
1. 空白對照組：
給予正常生活型態之光照，食物和水自由進食。
2. LED+Vehicle 組(LED 照光+Vehicle)：
於 Day(-5)至 Day16 每天早晚餵食兩次溶劑，其餘時間自由進食，平常給予正常生活光照，於 Day0 進行 4 小時實驗光照。
3. 投藥組(LED 照光+黃耆苷活性分子(Asg))：
從 Day(-5)到 Day16 每天定時餵食兩次且固定劑量的黃耆提取物(Asg)，其餘時間自由進食。平常給予正常生活光照，於 Day0 進行 4 小時實驗光照。

(3) 實驗光照：

於 Day0 早上餵藥完畢後，將小鼠放於曝光鏡箱中(其設計模仿小鼠飼育盒)。盒子上方裝有白色 LED 燈。光照進行 4 小時。避免影響照度，實驗過程中不給予飼料及水瓶。光照完畢返回正常生活之亮暗週期。

(4) 實驗設計(流程):

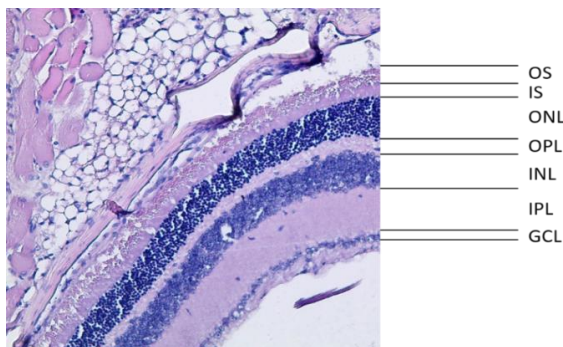
- 1.有一份專刊提到劑量高於 100g/kg 的草藥對小鼠無不良的反應，而腹腔注射劑量的 lethal dose 50 (LD50)已確認約為 40g/kg⁽¹⁷⁾。本研究給予小鼠之固定劑量在安全範圍內。
- 2.考量藥物動力學及其預防作用，提早 5 天開始餵藥。



(5) 視網膜組織染色切片:

Day16 犧牲後進行 HE 染色，觀察其視網膜組織、感光細胞的顆粒數並利用軟體分析視網膜組織地形圖。

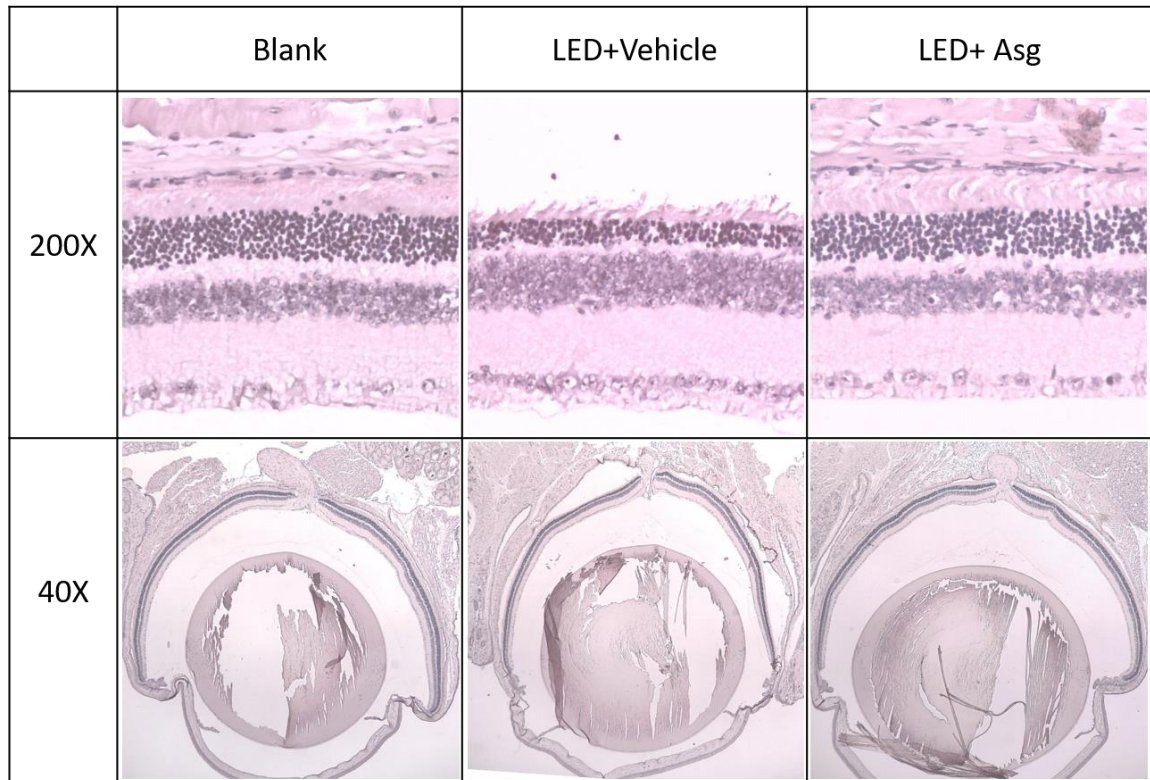
- 1.組織染色切片
- 2.視網膜地形圖



圖片來源：實驗室提供 - HE 染色

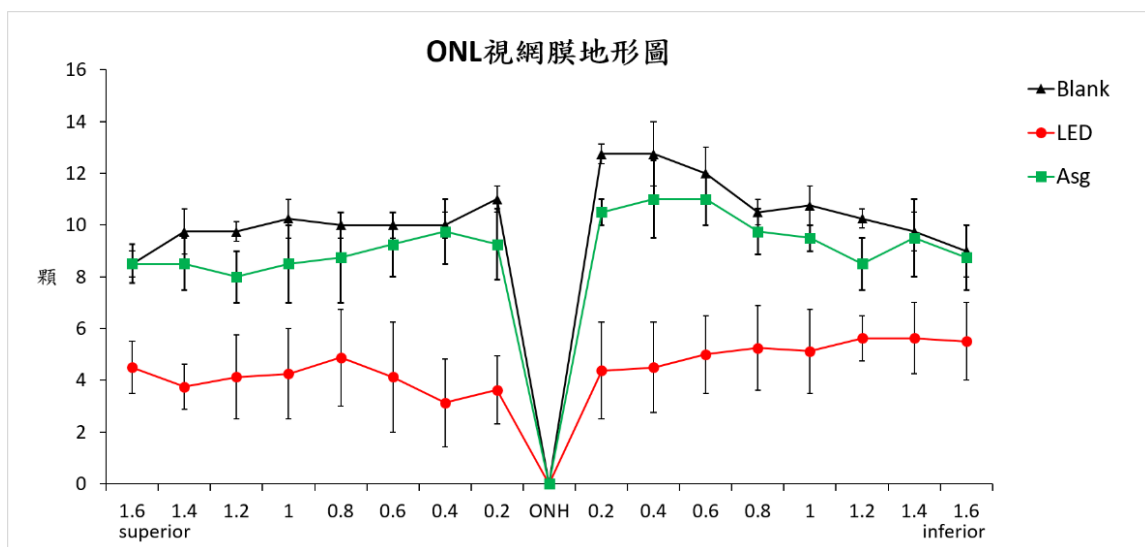
五、結果與討論

- (1)根據組織染色定性結果，比較空白對照組與 LED+Vehicle 組，LED+Vehicle 組的感光細胞外段與感光細胞內段(OS/IS)長度較短，且 LED+Vehicle 組感光細胞的細胞核(外核層 ONL)在厚度上有變薄的趨勢，細胞顆粒數也明顯較空白對照組組稀疏。
- (2)比對 LED+Vehicle 組與投藥組的視網膜定性照片，投藥組小鼠的視網膜感光細胞在損傷後第 16 天觀察到 OS/IS 較 LED+Vehicle 組長，且 ONL 顆粒數也較高。



(3) 利用軟體分析視網膜組織並將 OS/IS 長度以及 ONL 顆粒數量化並繪製成視網膜地形圖，根據圖表顯示，LED+Vehicle 組的小鼠與空白對照組的小鼠相比下，視網膜有較少的感光細胞顆粒數以及較短的 OS/IS。

(4) 將投藥組與 LED+Vehicle 組的數據相互比較，投藥組的小鼠視網膜 OS/IS 厚度較 LED+Vehicle 組厚，且 ONL 細胞顆粒數也較 LED+Vehicle 組多。由此實驗定量結果可以推測，黃耆苷活性成分(Asg)可能具有保護視網膜感光細胞的功能，並減低高能量可見光帶來的組織傷害。



六、結論

根據分析後的結果，接受高能量可見光(如實驗損傷模式 LED 光照)會對視網膜感光細胞產生一定程度的破壞。實驗末端結果顯示:在 LED 光照下，LED+Vehicle 組的小鼠與投藥組的小鼠相比，發現其視網膜組織結構具有較嚴重的傷害。由此證實黃耆苷活性成分(Asg)能夠降低 LED 誘導的感光細胞損害，其具有保護 OS/IS 以及 ONL 之組織完整性與厚度的趨勢。期望能進一步進行黃耆苷活性成分(Asg)的藥效驗證，應用於臨床退化性視網膜疾病預防及高齡視覺保健照護需求。

七、參考文獻

- (1) Kandel, E. R.; Schwartz, J.H.; Jessell, T.M.; Principles of Neural Science (4th ed.) p. 507–513. ISBN 0-8385-7701-6
- (2) P N Youssef¹, N Sheibani¹ and D M Albert¹ ; **Retinal light toxicity**; Eye(2011) 25, 1–14; 29 October 2010
- (3) Tinghuai Wu, Yueguo Chen, Samuel KS Chiang, Mark OM Tso; **NF-kappaB activation in light-induced retinal degeneration in a mouse model**; Biochemistry and Molecular Biology; September 2002
- (4) Molecular Biology Web Book; Chapter4 Gene Transcription; NF-κB
- (5) Shuji Nakamura, Takashi Mukai, and Masayuki Senoh; **Candela-Class High-Brightness InGaN/AlGaIn Double-Heterostructure Blue-Light-Emitting-Diodes**; Appl. Phys. Let-t., Vol. 64, No. 13; 28 March 1994
- (6) Makoto Bessho, Keiichi Shimizu; **Latest trends in LED lighting**; Electronics and Communication in Japan; 21 December 2011
- (7) LEDinside <http://www.ledinside.com.tw/knowledge/20071001-894.html>
- (8)衛生福利部國家中醫藥研究所;黃耆藥理成分研究新知;中醫藥新知;民國 100 年 2 月號
- (9)医学百科 http://big5.wiki8.com/huangqi_75403/
- (10)桃園長庚紀念醫院中醫藥劑部藥師邱秀麗、楊榮季; **黃耆研究及應用**; Pharmaceutical Sciences 藥物科學，第 28 卷第 4 期，Dec.31.2012
- (11)ChemFace, Astragaloside
- (12)Zhang Q, Gao WY, Zhang Y, Chen BY, Chen Z, Zhang WS, Man SL; **Protective effects of astragalus extract against intermittent hypoxia-induced hippocampal neurons impairment in rats.** ; Chinese medical journal 126(8):1551-4; April 2013
- (13)LEI Hong et al; **Anti-aging effect of astragalosides and its mechanism of action**; Acta Pharmacol Sin; 2003 Mar 24
- (14)Wei-Jian Zhang, Balz Frei; **Astragaloside IV Inhibits NF-κB Activation and Inflammatory Gene Expression in LPS-Treated Mice**; Mediators of Inflammation 2015(10):1-11; 2015 Apr 16.

- (15) 孙丽, 王岭, 李艳, 张进, 房雷; 黄芪甲苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用和机制研究; 中国临床神经科学 2014 年 01 期
- (16) Yuzhi Ding, Songtao Yuan, Xiaoyi Liu, Pingan Mao, Chen Zhao, Qiong Huang, Rihua Zhang, Yuan Fang, Qinglu Song, Dongqing Yuan, Ping Xie, Yun Liu, and Qinghuai Liu; **Protective Effects of Astragaloside IV on db/db Mice with Diabetic Retinopathy**; PlosONE TENTH ANNIVERSARY; 2014 Nov
- (17) Astragalus membranaceus monographs; Alternative Medicine Review; Volume 8, Number 1; 2003; p.76