

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 緩解視網膜發炎退化之藥效生物篩選：黃耆活性萃取物 用於抑制視網膜微膠細胞活化之作用
------------	--

執行計畫學生：歐綺家

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-027-B

研究期間：107年07月01日至108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 108年03月04日

緩解視網膜發炎退化之藥效生物篩選:

黃耆活性萃取物用於抑制視網膜微膠細胞活化之作用

Pharmacological selection of relieving the retinal inflammatory degeneration: investigating bioactive ingredient of Astragalus for attenuating the retinal microglia abnormal activation

學生：歐綺家 (Chi-Chia Ou)

指導教授：陳伯易 (Bo-Yie Chen) 副教授

壹、摘要：

現今高齡視覺退化問題日益嚴重，視網膜發炎損傷為造成視覺老化的病因之一，因此預防與緩減視網膜發炎損傷已是不容忽視的重要課題。本實驗室已驗證高能量可見光(LED 光)會誘導小鼠視網膜組織損傷，推測為小鼠視網膜組織可能有微膠細胞(microglia)相關發炎反應，刺激微膠細胞(microglia)的異常活化，並破壞血液視網膜障壁(blood-retinal barrier, BRB)的通透性，進而造成免疫細胞浸潤，加速視網膜組織的退化。本研究建立 LED 光誘導視網膜發炎損傷生物模式，其平台重要性在於可以模擬人類眼科臨床疾病，舉凡青光眼(Glaucoma)、糖尿病視網膜病變(Diabetic retinopathy, DR)及老年性黃斑部病變(Age-related macular degeneration, AMD)皆與視網膜發炎損傷有高度的病理相關性。本實驗室透過強光誘導視網膜發炎損傷的平台:發現黃耆活性萃取物(Asg)具有保護視網膜組織的效果。本研究進一步探討黃耆活性萃取物(Asg)用於視網膜炎性損傷的效果。採取動物模式，實驗分析採取 IHC 染色方法，以 Iba-1 抗體量化及分析視網膜微膠細胞(microglia)的訊號於 LED 光損傷視網膜組織的表現。研究結果說明:口服黃耆活性萃取物(Asg)有緩解 LED 光誘導視網膜微膠細胞(microglia)異常活化表現的趨勢，尤其在視網膜下側解剖學部位其作用較明顯。實驗結果支持黃耆活性萃取物(Asg)預防性的使用可達到控制視網膜發炎損傷。

關鍵字: 黃耆活性萃取物(Asg)、視網膜發炎損傷、光誘導損傷平台、眼用保健藥物

貳、研究動機與研究問題：

一、研究動機

(1)文獻指出發炎的微膠細胞(microglia)會釋放有害的細胞因子如 Vascular endothelial growth factor (VEGF) [1]和 Tumor necrosis factor(TNF) [2]，導致視網膜組織啟動發炎機制。有動物研究證實黃耆活性萃取物(Asg)可以抑制微膠細胞的 TNF- α 發炎因子[3]，並降低米勒氏細胞中 VEGF 的過度表達[4]。因此本研究嘗試以強光誘導小鼠視網膜組織發炎損傷之平台，探討並驗證口服黃耆活性萃取物(Asg)是否能抑制微膠細胞的異常活化，達到延緩視網膜發炎反應之效果。

(2)本實驗室已有小鼠動物模型的生物驗證，顯示口服黃耆活性萃取物(Asg)在視網

膜組織表現上有保護的效果。因此想進一步探討黃耆活性萃取物(Asg)對於視網膜光損傷模式的藥理保護機制，是否透過早期阻斷視網膜發炎反應及其後續發炎浸潤的問題，延緩視覺功能快速損失的發展。

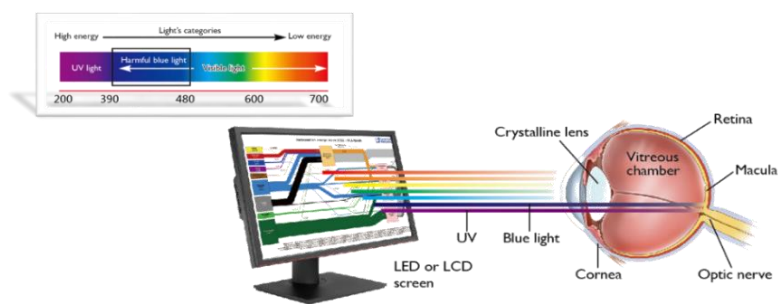
二、研究探討的核心問題

- (1) 探討在光誘導視網膜損傷之動物模式下，口服黃耆活性萃取物(Asg)是否能抑制微膠細胞的訊號表現，達到緩減視網膜發炎退化之藥理功效。
- (2) 以 IHC 染色方法量化分析黃耆活性萃取物(Asg)的訊號量，評估各組間視網膜微膠細胞的表現相關性。

參、文獻回顧與探討：

一、高能量可見光誘導的視網膜損傷：

藍光為短波長高強度的可見光，波長在 400 – 500 nm 之間，有別於其他光波段，可以穿透眼前段直接到達視網膜結構，使得藍光成了眼後段主要的傷害來源。由於視網膜進行光化學反應時，需消耗大量的氧氣進行氧化反應以產生能量，但在藍光的照射下氧化物容易釋放出毒性的自由基，造成視網膜細胞傷害。加上視網膜感光細胞內的外節(Outer segment ,OS)含有高濃度的不飽和脂肪酸(DHA)，其在高強度的藍光刺激下，更易提高脂肪酸過氧化反應的敏感度，進而產生大量的自由基及氧化產物，使視網膜組織啟動細胞凋亡機制，加速視網膜結構與功能退化的速度。此損傷機制提供強光誘導視網膜損傷的範例，且可進一步闡明眼科臨床疾病的發展過程，並為診斷和治療提供理論基礎[5] [6]。



(圖片來源 http://event.msi.com/aio/2014/Anti_Flicker/) [7]

二、黃耆活性萃取物(Asg)：

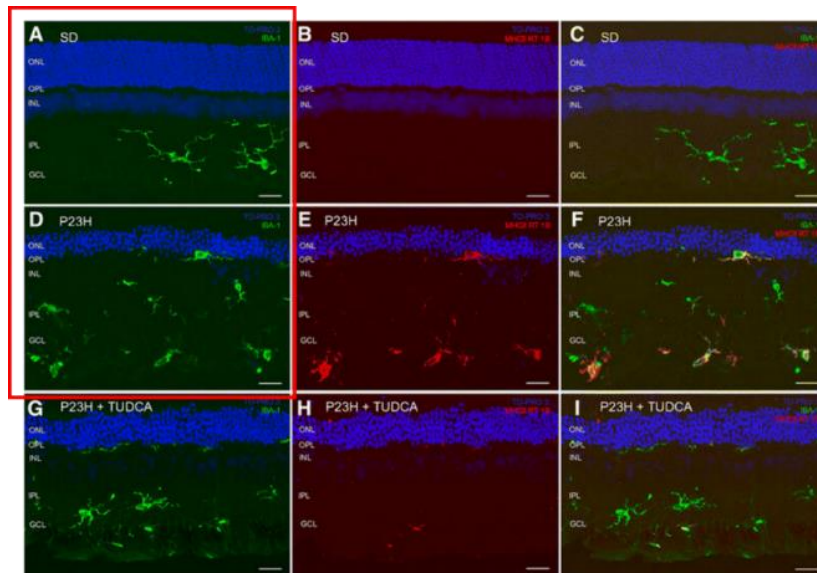
黃耆(Astragalus) 是常見的市售中藥材之一，最早出現在神農本草經上，被列為上品，來自蒙古黃耆或膜莢黃耆的乾燥根，為豆科多年生草本植物，主產於內蒙古、山西、甘肅、黑龍江一帶。黃耆(Astragalus)內含有三種主要化學成分：皂苷(saponins)、類黃酮(flavonoids)、多糖皂素(polysaccharides)。皂苷(saponins)以降低膽固醇，改

善免疫系統和預防癌症的能力著稱；類黃酮(flavonoids)則可以抗氧化，調控和清除自由基，並且預防心臟病、癌症和免疫缺陷病毒；多醣皂素(polysaccharides)具有抗微生物，抗病毒和抗發炎等功效[8] [9] [10]。傳統中藥用來補氣利尿、壯脾胃、排膿止痛、活血生血，常與當歸一起使用。近年來動物研究指出黃耆具有抗發炎[11] [12]、抗氧化[13]、抗凋亡[14]、抑制發炎因子 TNF- α , NF- κ B [15]等功效，另外在糖尿病視網膜病變模式下，可降低 Müller 細胞中 VEGF 的過度表達[4]。

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

在健康的視網膜中，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)，偶爾也出現在外網狀層(Outer plexiform layer, OPL)。從染色中可觀察到這些未活化的微膠細胞體具有薄且細長的突起[16]。

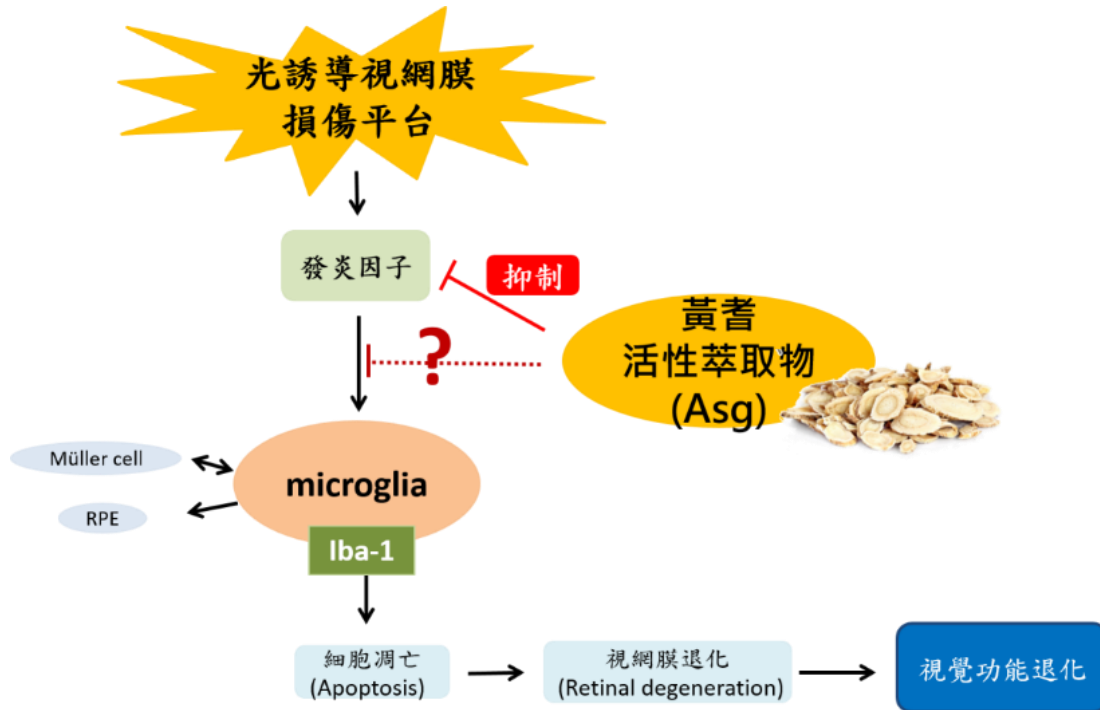
在光損傷的視網膜中，微膠細胞(microglia)從休眠轉變為活化狀態，從內部遷移到外部視網膜，在 Iba-1 免疫染色下可看到微膠細胞從視網膜色素上皮(Retinal Pigment Epithelium, RPE)至神經節細胞層(Ganglion cell layer, GCL)皆可觀察到訊號表現，同時可觀察到細胞體變大、細胞突起變厚，以增加接觸面積並加速細胞代謝進程[17]。



(A 圖為健康視網膜下 Iba-1 的分布位置，D 圖為損傷後視網膜內 Iba-1 的分布位置，圖片來源: Noailles ,A.,et al.,Microglia activation in a model of retinal degeneration and TUDCA neuroprotective effects. J Neuroinflammation, 2014.)

四、光致視網膜炎性損傷與微膠細胞的交互關係：

視網膜光損傷誘導發炎退化因子釋放，微膠細胞的活化表現與發炎反應表現在 Iba-1 蛋白上，有證據表明活化的微膠細胞可以啟動雙向調節信號的程序(bidirectional microglia-Müller cell)，調節感光細胞的細胞凋亡(apoptosis)機制[17]，帶動米勒氏細胞(Müller cell)和視網膜色素上皮(Retinal Pigment Epithelium, RPE)產生發炎反應，進而破壞血液視網膜屏障(Blood Retina Barrier, BRB)，造成視覺功能的退化[18] [19]。



五、對應至臨床眼科疾病之探討：

已有許多文獻指出：視網膜微膠細胞(microglia)活化誘導的發炎損傷可能與人類眼科臨床疾病有關，例如老年性黃斑部病變(Age-related macular degeneration, AMD)、糖尿病視網膜病變(Diabetic retinopathy, DR)及青光眼(Glaucoma)等。

(1) 老年性黃斑部病變(Age-related macular degeneration, AMD):

老年性黃斑部病變(AMD)為視網膜色素上皮(Retinal Pigment Epithelium, RPE)及感光細胞(Photoreceptor)受損引起的視力退化。已有文獻指出微膠細胞(microglia)和視網膜色素上皮(RPE)之間的相互作用可能導致與AMD相關的炎性病因而[20]。在小鼠模型和人類疾病中，異常活化的微膠細胞會遷移至視網膜外側，誘導視網膜色素上皮(RPE)表達更高濃度的發炎性細胞因子(IL-1 β , TNF- α , IL-6)和促血管生成因子(VEGF, MMP-1,-2,-9)，此病理現象可能使視網膜色素上皮(RPE)的功能和結構損傷與退化，從而促進脈絡膜血管的新生，最終驅動老年性

黃斑部病變(AMD)的發病機制和進展。

(2) 糖尿病視網膜病變(Diabetic retinopathy, DR)

糖尿病視網膜病變(DR)是經視網膜血管的新生和滲漏所引起。有生物證據顯示視網膜微膠細胞的發炎反應在糖尿病視網膜病變(DR)中扮演不可或缺的角色。異常的微膠細胞會釋放促血管生成因子(MMP-9)，破壞與 DR 發展相關的血液視網膜屏障(Blood retinal barrier, BRB)，使血液視網膜屏障(BRB)的穩固性降低。若能抑制微膠細胞 MMP-9 的活化，便能進一步緩解糖尿病視網膜病變(DR) [21]。

(3) 青光眼(Glaucoma)

青光眼(Glaucoma)以視網膜神經節細胞(Retinal ganglion cell, RGC)退化為特徵，進而導致視神經損傷的視力損失。有研究表明，異常活化的微膠細胞會參與細胞凋亡機制並協助去除老死細胞，常出現在青光眼早期，可能進一步誘導青光眼後期發生視神經細胞凋亡之現象。此研究推測抑制微膠細胞的異常活化，可以提升視網膜神經節細胞(RGC)的存活率，進而達到神經保護之效果[22]。

(4) 視網膜光損傷動物平台模擬視網膜微膠細胞之病理活化

已有期刊指出：於高能量強光損傷模式平台下，可誘導小鼠視網膜微膠細胞的型態改變，促使這些病理活化的微膠細胞從內側視網膜遷移至外側視網膜，進而釋放發炎因子，使視網膜細胞的組織及功能逐漸減退，最終導致視覺功能的退化[23]。前期大專生已透過光誘導視網膜發炎損傷平台篩選丹參水溶性活性分子(SAS)對於視網膜發炎退化的保護作用。本計畫運用此平台模擬視網膜微膠細胞的病理性活化，未來預期可以運用於相關的眼科臨床退化性疾病，提供臨床疾病與視網膜微膠細胞發炎退化之參考指標，並進一步進行藥效生物篩選，期望有助於緩解視網膜發炎損傷之退化問題。

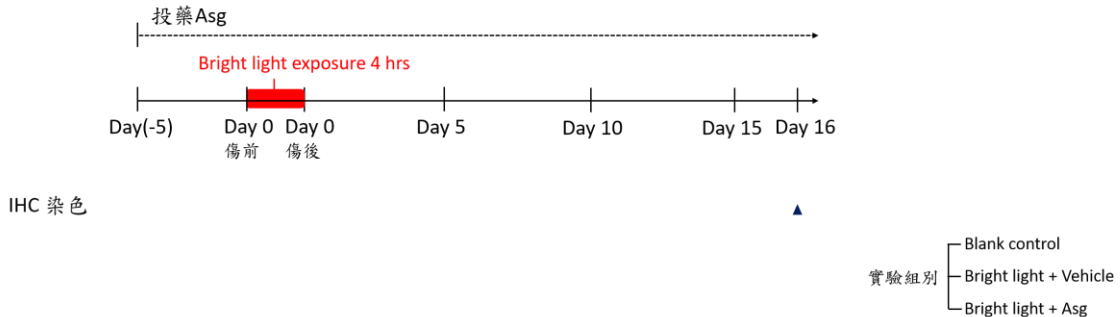
肆、研究方法與步驟：

一、實驗材料：

- (1) ICR 品系小鼠
- (2) 市售 9W LED 燈
- (3) 急性光損傷設備套組
- (4) 餵食針
- (5) 計時器
- (6) Iba-1 染色套組

二、實驗流程：

實驗期間給予正常飲用水及飼料。實驗流程如下圖：



三、實驗組別：

本實驗採用 ICR 九週齡母鼠，分成對照組與實驗組共三組：

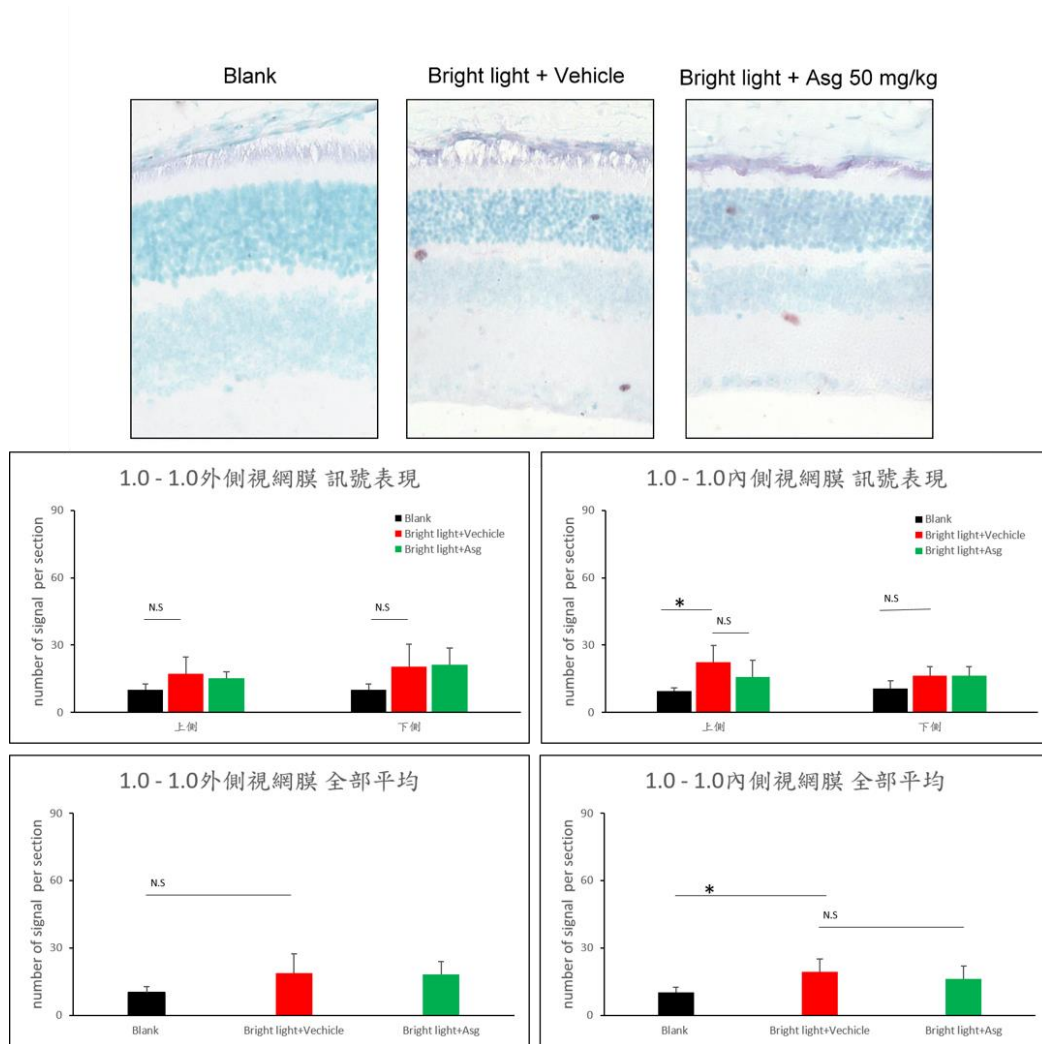
- (1) 空白對照組(Blank control group)：實驗期間在正常光照環境下生活 21 天。
- (2) 強光損傷組(Bright light + Vehicle group)：於 Day 0 持續 4 小時強光照射，其餘時間於正常光照環境下生活。並於 Day (-5)開始口服溶劑(Vehicle)，一天兩次。
- (3) 強光損傷並口服黃耆活性萃取物預防組(Bright light + Asg group)：於 Day 0 持續 4 小時強光照射，其餘時間於正常光照環境下生活。並於 Day (-5)開始口服黃耆活性萃取物(Asg)。

四、實驗數據分析點：

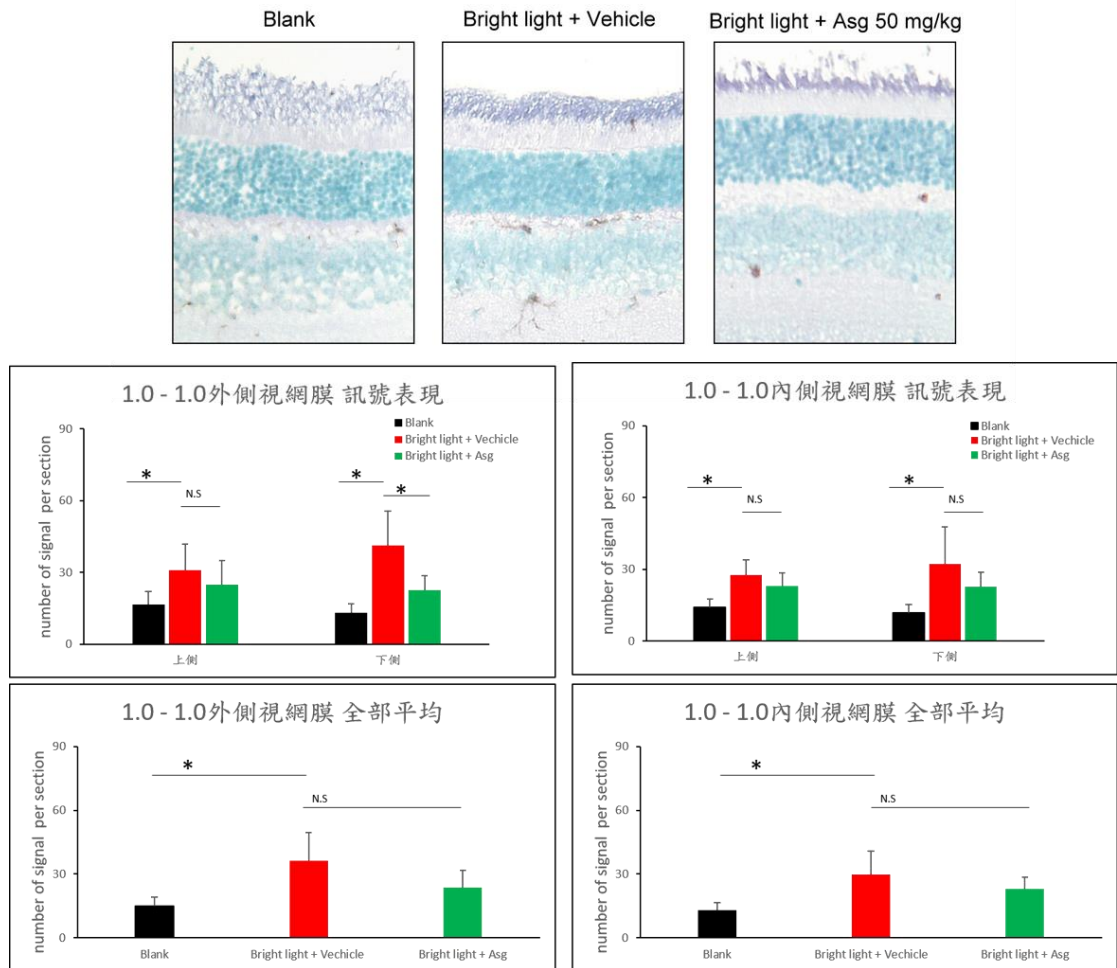
三組皆於 Day 16 犧牲後進行 IHC 染色，藉此提供黃耆活性萃取物(Asg)用於緩解視覺發炎損傷的生物證據。

伍、實驗結果與討論：

1. 研究結果如下圖：於定性圖上比較空白對照組(Blank)和強光損傷組(Bright light + Vehicle)的微膠細胞訊號量，於兩組間可觀察訊號表現量有些微差異。接著比較強光損傷組(Bright light + Vehicle)和強光損傷並口服黃耆活性萃取物預防組(Bright light + Asg)的訊號量，初步評估兩組間於定性圖上並無明顯差異。進一步針對各組間進行量化分析，發現數據於 SPSS18 統計分析皆未達到統計顯著性。根據文獻資料指出：在強光誘導視網膜損傷的大鼠動物模式平台下，損傷後 48 小時的視網膜微膠細胞數量會達到峰值，並於傷後 7 天數量就漸趨減少[24]。因此，本研究嘗試將實驗末端分析時間點由傷後 16 天往前推移至傷後 48 小時，再一次驗證分析於強光損傷平台下，口服黃耆活性萃取物(Asg)用於緩減視網膜微膠細胞發炎活化之趨勢。



2. 數據分析點於傷後 48 小時的研究結果如下圖：空白對照組(Blank)和強光損傷組(Bright light + Vehicle)的量化數據具有統計上的顯著性差異($p=0.002$, $p=0.005$)。接著比較強光損傷組(Bright light + Vehicle)和強光損傷並口服黃耆活性萃取物預防組(Bright light + Asg)，於定性圖上可觀察到強光損傷並口服黃耆活性萃取物預防組(Bright light + Asg)的微膠細胞訊號表現量有減少的趨勢，進一步量化分析可發現於下側的外側視網膜具有統計顯著性($p=0.018$)，其餘視網膜區域的圖表數據則顯示有緩解視網膜微膠細胞訊號量的趨勢。



3. 本計畫透過 Iba-1 蛋白指標探討視網膜微膠細胞的訊號量表現，並於相同的強光損傷平台下，採取不同實驗末端時間點，分別為傷後 16 天及傷後 48 小時，比較兩者之間的訊號表現量有無差異。研究結果說明口服黃耆活性萃取物(Asg)有減少視網膜微膠細胞(microglia)訊號表現量的趨勢，進而達到緩解視網膜損傷之功效，並於傷後 48 小時的研究數據顯示，口服黃耆活性萃取物(Asg)的視網膜微膠細胞訊號量有較明顯的減緩趨勢。

陸、結論：

由定性及定量分析結果顯示：Iba-1 蛋白指標無論於傷後 16 天或傷後 48 小時的強光損傷模式平台下，口服黃耆活性萃取物(Asg)皆有減少視網膜微膠細胞訊號量的趨勢，並於傷後 48 小時的數據圖表顯示，在下側的外側視網膜具有統計顯著性。未來期望透過不同的實驗設計，如：慢性光損傷模式，或嘗試使用其他生物驗證方式標定視網膜微膠細胞。進一步分析與驗證黃耆活性萃取物(Asg)於強光損傷模式平台下有保護視網膜的功效，並繼續深入探討黃耆活性萃取物(Asg)用於緩減視網膜微膠細胞的保護機制，

預期可以運用於相關的眼科臨床退化性疾病，提供臨床疾病與視網膜微膠細胞發炎退化之保健用藥參考指標。

柒、研究資源：

本專生計畫執行搭配指導教授科技部計畫：黃耆提取物用於緩解視網膜老化及視覺功能重建的機轉及其應用之研究 (MOST-107-2320-B-040-003-MY2)。

捌、參考文獻：

1. Giaume, C., et al., *Glia: the fulcrum of brain diseases*. Cell Death Differ, 2007. **14**(7): p. 1324-35.
2. Wang, H., et al., *Inhibitory Activity of Ficus deltoidea var. trengganuensis Aqueous Extract on Lipopolysaccharide-Induced TNF- α Production from Microglia*. Evid Based Complement Alternat Med, 2017. **2017**.
3. Tan, S., et al., *Preventive Effects of a Natural Anti-Inflammatory Agent, Astragaloside IV, on Ischemic Acute Kidney Injury in Rats*. Evid Based Complement Alternat Med, 2013. **2013**.
4. Ke, M., et al., *The effect of astragalin on the VEGF production of cultured Muller cells under high glucose conditions*. Biomed Mater Eng, 2012. **22**(1-3): p. 113-9.
5. *LIGHT-INDUCED DAMAGE to the RETINA*. 2018; Available from: <http://photobiology.info/Rozanowska.html>.
6. Narimatsu, T., et al., *Blue light-induced inflammatory marker expression in the retinal pigment epithelium-choroid of mice and the protective effect of a yellow intraocular lens material in vivo*. Exp Eye Res, 2015. **132**: p. 48-51.
7. PC, M.A.-i.-O., *MSI All-in-One PC | Eye Protect Tech - Best visual experience*. 2018.
8. 黃耆在中藥方面的文獻. 2018; Available from: <http://yibian.hopto.org/yao/?yno=1>.
9. 2018.
10. Liu, P., H. Zhao, and Y. Luo, *Anti-Aging Implications of Astragalus Membranaceus (Huangqi): A Well-Known Chinese Tonic*. Aging Dis, 2017. **8**(6): p. 868-886.
11. Zhang, H., et al., *[Anti-inflammatory effect and mechanisms of Huangqi glycoprotein in treating experimental autoimmune encephalomyelitis]*. Folia Neuropathol, 2017. **55**(4): p. 308-316.
12. Zhou, X., et al., *Astragaloside IV from Astragalus membranaceus ameliorates renal interstitial fibrosis by inhibiting inflammation via TLR4/NF- κ B, Cyr11cB in vivo and in vitro*. Int Immunopharmacol, 2017. **42**: p. 18-24.
13. Wang, H.L., et al., *Astragaloside IV for Experimental Focal Cerebral Ischemia: Preclinical Evidence and Possible Mechanisms*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**.
14. Huang, X.P., et al., *Combination of total Astragalus extract and total Panax notoginseng saponins strengthened the protective effects on brain damage through improving energy metabolism and inhibiting apoptosis after cerebral ischemia-reperfusion in mice*. Chin J

- Integr Med, 2017. **23**(6): p. 445-452.
15. Li, L., et al., *Research review on the pharmacological effects of astragaloside IV*. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2018. **31**(1): p. 17-36.
 16. Noailles, A., et al., *Microglia activation in a model of retinal degeneration and TUDCA neuroprotective effects*. *J Neuroinflammation*, 2014. **11**: p. 186.
 17. Harada, T., et al., *Microglia–Müller Glia Cell Interactions Control Neurotrophic Factor Production during Light-Induced Retinal Degeneration*. 2002.
 18. Ibrahim, A.S., et al., *Retinal Microglial Activation and Inflammation Induced by Amadori-Glycated Albumin in a Rat Model of Diabetes*, in *Diabetes*. 2011. p. 1122-33.
 19. Bejarano-Escobar, R., et al., *Light-induced degeneration and microglial response in the retina of an epibenthonic pigmented teleost: age-dependent photoreceptor susceptibility to cell death*. 2012.
 20. Ma, W., L. Zhao, and W.T. Wong, *Microglia in the Outer Retina and their Relevance to Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration (AMD)*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **723**: p. 37-42.
 21. Zhu, S.H., et al., *Paeoniflorin Suppressed High Glucose-Induced Retinal Microglia MMP-9 Expression and Inflammatory Response via Inhibition of TLR4/NF-kappaB Pathway Through Upregulation of SOCS3 in Diabetic Retinopathy*. *Inflammation*, 2017. **40**(5): p. 1475-1486.
 22. Wang, J.W., et al., *Retinal Microglia in Glaucoma*. *J Glaucoma*, 2016. **25**(5): p. 459-65.
 23. Song, D., et al., *Complement C5a receptor knockout has diminished light-induced microglia/macrophage retinal migration*, in *Mol Vis*. 2017. p. 210-8.
 24. Collier, R.J., et al., *Complement Deposition and Microglial Activation in the Outer Retina in Light-Induced Retinopathy: Inhibition by a 5-HT1A Agonist*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2018. **52**(11): p. 8108-8116.