

科技部補助  
大專學生研究計畫研究成果報告

計畫名稱：黃耆苷活性分子於緩解視網膜光損傷模式之濃度依賴特性探討

執行計畫學生：王聖喬

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-087-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：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 108年03月07日

# 黃耆苷活性分子於緩解視網膜光損傷模式之濃度依賴特性探討

## Study the Protecting Effect of the Astragaloside Active Ingredient in Light-induced Retinal Photodamage Model with Dose Dependent Manner.

學生：王聖喬 (Sheng-Chiao-Wang)

指導教授：劉智誠 (Jym-cheng, Liou) 醫師、陳伯易 (Bo-Yie Chen) 副教授

### 一、摘要

隨著全球社會結構高齡化，以及 3C 產品的迅速普及與廣泛應用，高能量可見光誘導的老年性黃斑部退化、糖尿病視網膜損傷、青光眼等視覺退化人口比例逐年上升，醫療的觀點也漸由治療轉為預防。如何能有效的預防疾病的發展成了當代視覺保健中極需被重視的一環。光誘導的視網膜光化學損傷主要來自於高能量可見光刺激造成的氧化反應，前期大專生結合傳統中醫草藥黃耆苷活性分子(Asg)並以高能量 LED 建構的視網膜光損傷小鼠模型驗證，探討黃耆苷活性分子對感光細胞的保健效果，實驗結果顯示黃耆苷活性分子(Asg)可以預防高能量可見光誘導的視網膜損傷。為了提高黃耆苷活性分子(Asg) 於高齡視覺保健與預防視網膜疾病的實用性並創造更多臨床眼科應用以及產業發展的機會，本次實驗進一步比較不同劑量之黃耆苷活性分子(Asg)對視網膜組織保護的效果並探討其保護功效是否具有濃度依賴的特性。延續前期實驗分析策略，以 ICR 小鼠 LED 視網膜光損傷模式進行，將組別分為(1)空白對照組(Blank Control group); (2) LED 光損傷+Vehicle 組; (3) LED 光損傷+ Asg 低劑量組; (4) LED 光損傷+ Asg 中劑量組; (5) LED 光損傷+ Asg 高劑量組。實驗末端數據顯示，於損傷前給予黃耆活性分子(Asg)能降低高能量可見光對視網膜損害的程度，且於此傷害模式下黃耆活性分子(Asg)的預防功效也隨著劑量的提高而有所提升。結果說明：於高能量可見光誘導的視網膜損傷動物模式，黃耆苷活性分子(Asg)對視網膜組織的正面保護效果與給予的濃度具有高度的相關性。

**關鍵字：**黃耆苷活性分子(Asg)、LED 高能量可見光、感光細胞、濃度依賴性

### 二、研究動機與研究問題

- (1) 近期有許多研究表明長期曝露於高能量可見光下會加速老年性黃斑部退化 (AMD) 等退化性疾病的發展，是目前視覺退化以及疾病發展的主要原因之一<sup>(1)</sup>。隨著人口高齡化以及對生活品質的要求的提高，預防視網膜退化可謂當前高齡視覺保健重要課題。
- (2) 近年有研究指出黃耆苷活性分子(Asg)在體內具抗氧化能力<sup>(2)</sup>以及神經保護的功效<sup>(3)</sup>。前期實驗以每天給予小鼠高劑量黃耆苷活性分子(Asg)的方式進行測試，結果發現黃耆苷活性分子(Asg)能有效的降低光誘導的視網膜損傷，作為預防視網膜光損傷的中草藥萃取物，推測其具有相當的發展潛力。
- (3) 延續前期大專生，本次實驗以高藍光 LED 視網膜光損傷小鼠模型為平台，進行不同濃

度的投藥，比較給予不同劑量之黃耆苷活性分子(Asg)於此傷害模式下的保護效果是否會依濃度變化而有不同，並探討此藥理功效是否具有濃度依賴的特性，以作為未來進一步研究與發展的基礎。

### 三、研究預期可解決的問題

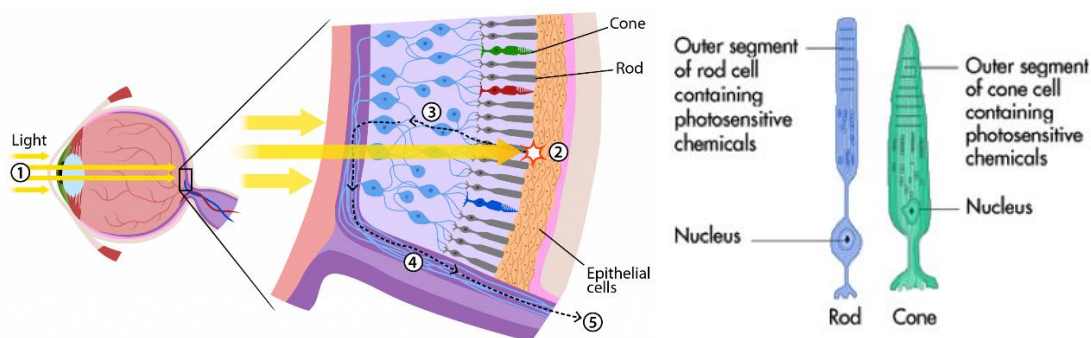
- (1) 比較低劑量組、中劑量組以及高劑量組對組織的保護效益。
- (2) 判斷其預防效果是否具有濃度依賴的特性。

### 四、文獻回顧與探討

#### (1) 視網膜與感光細胞

視網膜為眼後段一層薄薄的組織，通常將他分成十層，由外到內依序是色素上皮層(Retinal pigment epithelium, RPE)、感光細胞外節(Outer segment, OS)、感光細胞內節(Inner segment, IS)、外核層(Outer nuclear layer, ONL)、外網狀層(Outer plexiform layer, OPL)、內核層(Inner nuclear layer, INL)、內網狀層(Inner plexiform layer, IPL)、神經節細胞層(Ganglion cell layer, GCL)以及神經纖維層(Nerve fibre layer, NFL)。光線進入眼睛到達視網膜後是由感光細胞外節(Outer segment)接收光線並將光訊號轉為電化學訊號傳至大腦視覺皮質區產生視覺。所以在所有組織層中，以感光細胞損傷對視覺造成的影響最大。

感光細胞分為四個部分：外節(Outer segment)、內節(Inner segment)、細胞本體以及末梢突觸。外節內含有感光色素，是感光細胞中的感光部分。當光線進入感光細胞時光敏物質會改變並使感光細胞產生神經衝動，光敏物質可以再次合成並不斷的重複這樣的循環，稱為視覺循環(visual cycle)。感光細胞分為兩大類：桿狀細胞(rod cell)以及錐狀細胞(cone cell)。桿狀細胞負責我們在相對昏暗環境下的視覺，感光色素為視紫紅質，清晰度較差且不能分辨顏色，與暗視覺有關；錐狀細胞有三種感光色素，可以吸收不同波段的光，使我們產生色覺，而錐狀細胞需要較多光子才能激發，主導亮環境中的視覺，解析度較高<sup>(4)(5)</sup>。



圖片來源：<https://askabiologist.asu.edu/rods-and-cones>

圖片來源：<https://ionabio.weebly.com/>

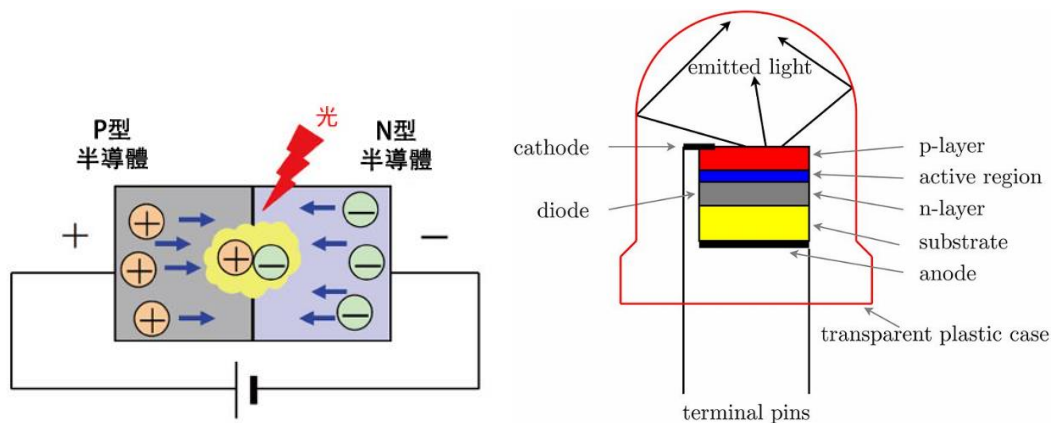
## (2) LED 誘導視網膜光損傷模型-氧化反應與藍光化學傷害

LED(發光二極體 Light Emitting Diode)，是一種特殊的二極體，由半導體建構 P、N 兩極。半導體界於沒有能隙的導體以極能隙大於 3 eV 的絕緣體之間，在接受一定能量的刺激後，電子即可躍遷至傳導帶<sup>(6)</sup>。將電池的正極接在 P 型半導體上產生電洞(電流)，將電池的負極接在 N 型半導體上使傳導帶上的電子增加(電子流)，當電子遇到電洞，能量便轉換成光能發散出來並回到基態，不同顏色的光線取決於材質的能隙大小，隨著使用的半導體不同而有所不同<sup>(7)(8)</sup>。

(資料來源：Wikipedia, Light Emitting Diode)

(資料來源：Latest trends in LED lighting)

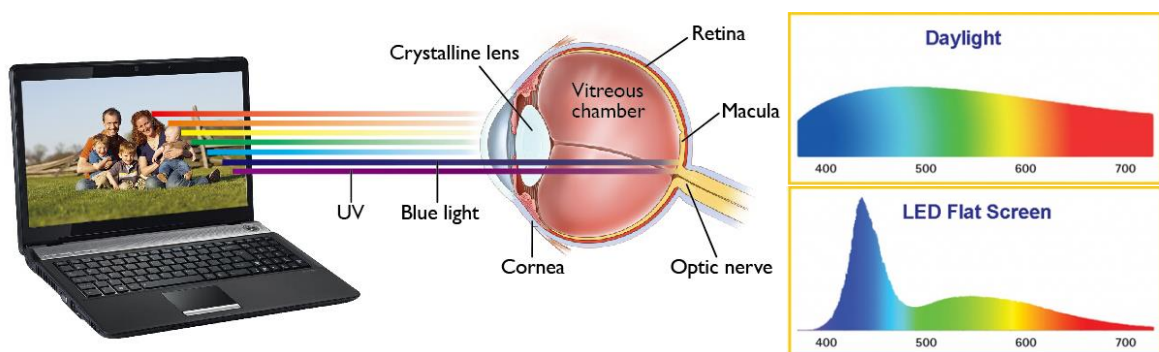
(資料來源：科技台灣)



圖片來源：[http://www.rohm.com.tw/web/taiwan/led\\_what1](http://www.rohm.com.tw/web/taiwan/led_what1)

圖片來源：<https://www.myledlightingguide.com/blog-what-is-an-led>

可見光位於光波段 400-700nm，意指人類可以透過眼睛感受到的光，相較於分布均勻的一般日光燈，LED 燈的主要落在短波長的部分。長波長的光能量較低、短波長的光能量較高，位於 400-500nm 間的藍紫光屬於高能量可見光，就是我們常常聽到的「藍光」。LED 燈對視網膜造成的傷害可能高過於一般燈泡。

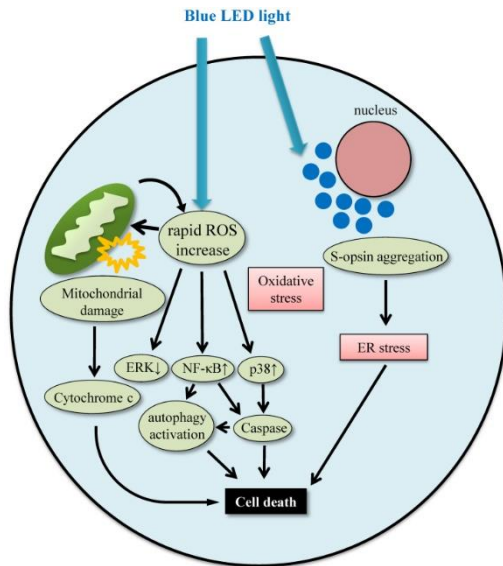


圖片來源：<http://www.wixtech.tw/goods.php?id=42>

圖片來源：<https://www.innovative-eyewear.com/bluelightprotection/information-about-blue-light/>

高能量可見光誘導的感光細胞變性及視覺退化與氧化反應有密不可分的關係。當高能量的光線照到視網膜上由感光細胞接收時，會引起網膜上分子的化學反應產生自

由基。自由基具有不成對電子且活性較高，會與感光細胞外節(Outer segment, OS)的不飽和脂肪酸廣泛地進行氧化反應(失去或得到電子)，造成連鎖反應使網膜組織組織凋亡以及崩解<sup>(9)</sup>。更有文獻指出光誘導的脂質過氧化(Lipid radical)終產物為老年性黃斑部病變(Age-related macular degeneration, AMD)發展的關鍵因子<sup>(10)</sup>。



圖片來源：<https://www.nature.com/articles/srep05223>

### (3) 黃耆(Astragalus)藥效

「黃」字指黃色，可為草藥的顏色，亦代表「中」、「土」、「脾」之色。「耆」字指耆老，長的意思。這個名稱表示黃芪為補藥中的耆老，為補藥之長<sup>(11)</sup>。為分布黑龍江、陝西、甘肅、內蒙古等地之同名豆科植物於春、秋兩季採挖後曬乾製成的乾燥根，別名內蒙黃耆、綿黃耆、箭芪，在神農本草經中被列為上品。黃耆是著名的補氣良藥，是臺灣近年來用量排名第一的中藥材<sup>(12)</sup>，性溫、味甘，傳統中草藥中有消腫利尿、擴張血管、治療膿瘡、緩解腹瀉、抗衰老、舒緩疲勞以及夠改善皮膚與血液循環的功用<sup>(13)</sup>。黃耆目前已經被分析出許多化學成分如黃耆多醣類 (astragalosides)、黃耆苷類 (astragalosides)、毛蕊異黃酮(calycosin)等，為其中主要有效成分之一<sup>(14)</sup>。近年來有許多學者以黃耆苷類(astragalosides)活性成分進行功效探討的動物實驗，證實在生物體內，黃耆苷活性成分有抗氧化降低自由基損傷<sup>(2)</sup>、增強免疫功能與抗發炎反應<sup>(15)(16)</sup>、神經保護的功效<sup>(3)</sup>。於眼球組織的保護，目前已有期刊指出黃耆苷活性成分在糖尿病小鼠中具有保護視網膜神經節細胞的效用<sup>(17)</sup>。



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

2004 年，Neuroscience Letters 由 YuminLuo 等人以注射的方式進行了黃耆苷活性

成分於小鼠大腦缺血損傷的抗氧化機制與神經保護作用的研究。於損傷後 72 小時進行犧牲並分析大腦組織梗塞死亡體積以及抗氧化酶 SOD 活性的測定。結果驗證黃耆苷活性成分在小鼠缺血性腦損傷模型中具抗氧化與神經保護作用<sup>(2)</sup>。

2015 年 Mei M 等人發表的一篇期刊中，他們以異丙基腎上腺素 (ISO) 誘導 Sprague-Dawley (SD) 大鼠之肥大心肌細胞凋亡為模型探討 astragalosides 對此傷害的抑製作用是否與抗氧化有關及 Calpain-1 有關。結果顯示，astragalosides 可以降低細胞凋亡的比率並維持粒線體完整，是經由降低氧化作用與 Calpain-1 之活性達到抗凋亡的功效<sup>(18)</sup>。

Meili Lu 等人以心肌缺血在灌注(MI / R)損傷大鼠的模式探討黃耆苷活性分子的抗炎以及抗凋亡作用。將大鼠分為假手術組，MI / R 組和 MI / R+投藥組。結果顯示，MI / R 組心肌 NF-κB(誘發發炎反應以及細胞凋亡)表達明顯增加，而投藥組 NF-κB 的表達明顯較低。且投藥組有效降低 MI/R 損傷誘導炎性細胞因子的水平。研究結果表明，黃耆苷活性分子透過 TLR4 / NF-κB 信號通路並抑制細胞凋亡，從而減輕大鼠 MI / R 損傷<sup>(14)</sup>。

孫麗等人以線栓法建立大鼠大腦中動脈缺血再灌注 (MCAO / R) 模型，並由腹腔注射黃耆注射液 (6 mL / kg)，末端使用西方墨點法檢測 BDNF 蛋白以及 PCR 檢測 BDNF 的基因表達。結果顯示，大鼠大腦海馬區 BDNF 蛋白和 BDNF mRNA 表達較對照組明顯增加，且動物神經行為功能顯著改善。表達而促進受損神經的修復，刺激神經再生，改善動物的神經行為功能<sup>(3)</sup>。

## 五、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，分成對照及實驗組別共 5 組：

#### 1. 空白對照組(Blank Control group)：

給予正常生活型態之光照，食物和水自由進食。

#### 2. LED 照光+Vehicle 組：

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. LED 照光+低劑量黃耆苷活性分子組：

從 Day (-5)到 Day 16 每天定時餵食兩次固定劑量之黃耆活性分子(Asg)，其餘時間自由進食。平常給予正常生活光照，於 Day 0 進行 4 小時實驗光照。

4. LED 照光+中劑量黃耆苷活性分子組：

從 Day (-5)到 Day 16 每天定時餵食兩次固定劑量之黃耆活性分子(Asg)，其餘時間自由進食。平常給予正常生活光照，於 Day 0 進行 4 小時實驗光照。

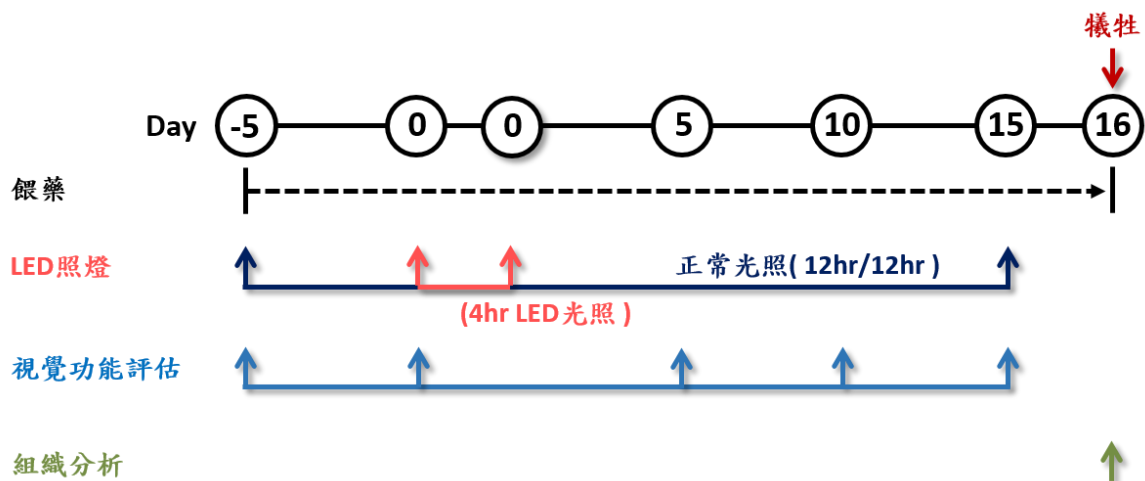
5. LED 照光+高劑量黃耆苷活性分子組：

從 Day (-5)到 Day 16 每天定時餵食兩次固定劑量之黃耆活性分子(Asg)，其餘時間自由進食。平常給予正常生活光照，於 Day 0 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。

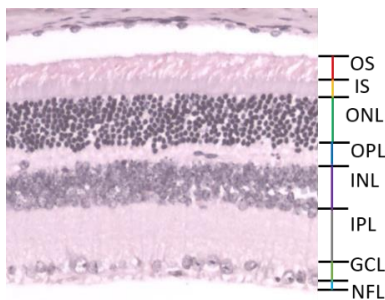
(4)實驗設計(流程):



(5)視網膜組織染色切片：

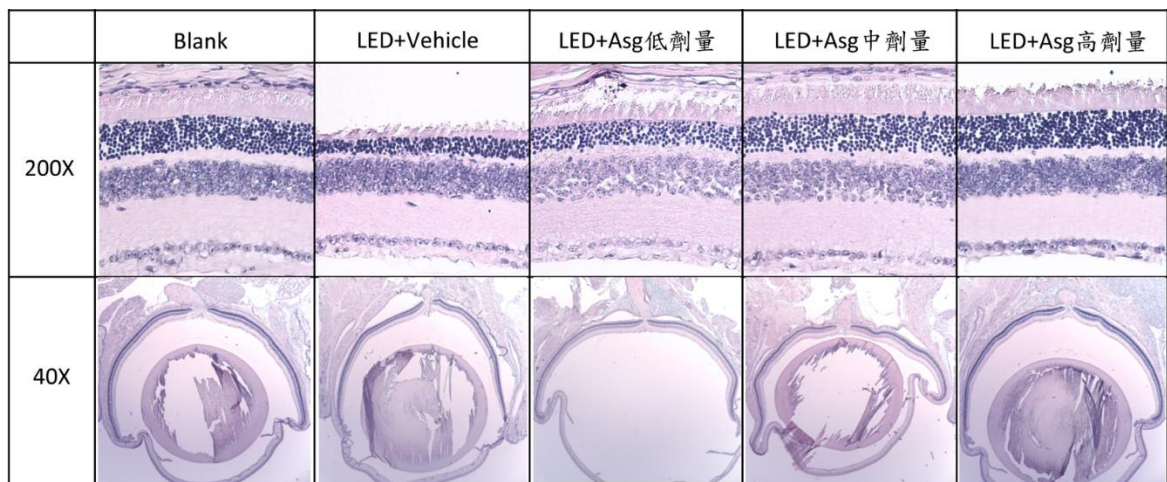
Day 16 犧牲後進行 HE 染色，觀察其視網膜組織、感光細胞的顆粒數並利用軟體分析視網膜組織地形圖。

- 1.組織染色切片(組織圖來自於前期大專生)
- 2.視網膜地形圖



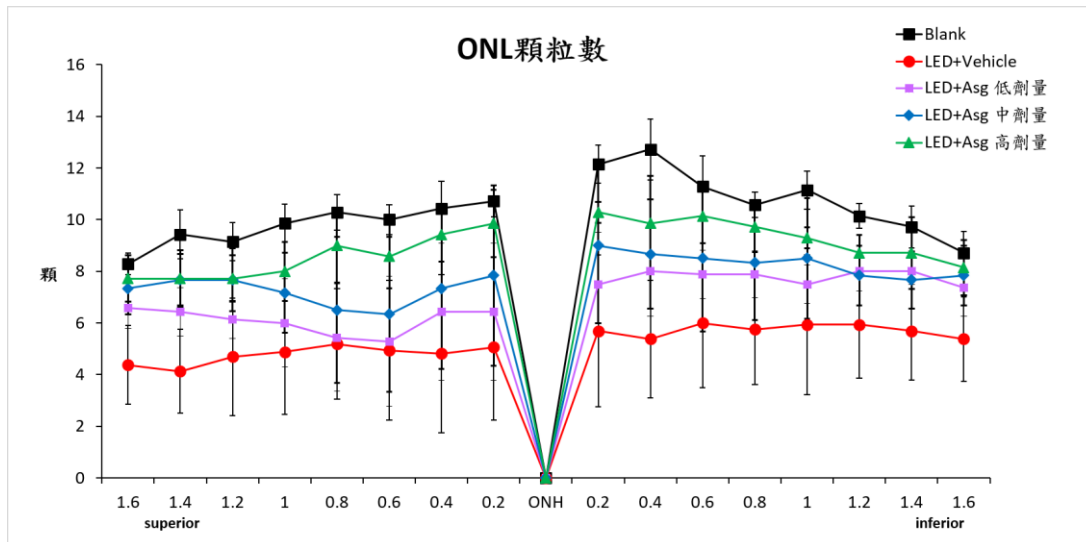
## 六、結果與討論

- (1)將空白對照組(Blank)與 LED+Vehicle 組的染色結果(200X)進行比較，LED+Vehicle 組的 OS/IS 長度較短，ONL 細胞顆粒數也較空白對照組組稀疏。
- (2)比較 LED+Vehicle 與低、中、高濃度黃耆活性分子(Asg)組的組織染色結果(40X)發現，中、高劑量下的組織較 LED+Vehicle、LED+Asg 低劑量組完整，且 RPE 與 OS/IS 的密合度也相對較好。
- (3)分別比較 LED+Asg 低、中、高劑量組以及 LED+Vehicle 組的視網膜照片(200X)，發現只要於 LED 損傷前預先餵食 Asg 藥物，不論劑量為低、中、高，於實驗末端觀察到的結果，OS/IS 皆較 LED+Vehicle 組長，且 ONL 顆粒密度也較高。
- (4)比較 LED+Asg 低劑量組與 LED+Asg 中劑量組的組織圖(200X)，LED+Asg 中劑量組的 OS/IS 以及 ONL 厚度皆較 Asg 低劑量組厚，也可從圖片中觀察到 LED+Asg 中劑量組的 ONL 感光細胞核顆粒數較多。
- (5)再比較 LED+Asg 中劑量組與 LED+Asg 高劑量組的組織圖(200X)，兩組的 OS/IS 與 ONL 厚度相當，但 LED+Asg 高劑量組的感光細胞密度較 Asg 中劑量組密集。



- (6)將軟體分析後 OS/IS 長度以及 ONL 顆粒數的數據分別繪製成視網膜地形圖，圖表顯示 LED+Vehicle 組的小鼠視網膜相比於空白對照組(Blank)有較少的感光細胞顆粒數以及較短的 OS/IS。
- (7)圖表顯示 LED+Asg 低劑量、LED+Asg 中劑量與 LED+Asg 高劑量的 OS/IS 長度以及 ONL 顆粒數均較 LED+Vehicle 組長且密集，但單純比較三投藥組高劑量的效果比中劑量好，而中劑量的效果有略優於低劑量組。





## 七、結論

透過上期大專生研究接受高能量可見光對視網膜感光細胞產生破壞的損傷模式，本次實驗進一步探討黃耆活性分子(Asg)對視網膜組織的保護功效與其用藥濃度的關係。根據實驗分析，數據顯示預先給予鼠高劑量黃耆活性分子(Asg)能有效降低高能量可見光誘導的視網膜損傷，另一方面，給予中劑量以及低劑量黃耆活性分子(Asg)同樣能達到預防高能量可見光誘導視網膜損傷的效果，然而相較於高劑量黃耆活性分子(Asg)其保護效果較不明顯。同時數據也顯示黃耆活性分子(Asg)的預防效果會隨著給予劑量的提高而有所提升。透過此研究，希望能增加黃耆活性分子(Asg)於視網膜疾病預防以及高齡視覺保健的實用性，創造更多於一般臨床眼科應用的機會並提升產業發展上的價值。

## 八、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)。

## 九、文獻參考

- (1)Sui GY, Liu GC, Liu GY, Gao YY, Deng Y, Wang WY, Tong SH, Wang L; **Is sunlight exposure a risk factor for age-related macular degeneration? A systematic review and meta-analysis;** Br J Ophthalmol; 2013 Apr; 97(4):389-94.
- (2)Yumin Luo, ZhenQin, ZhenHong, XinminZhang, DingDing, Jian-HuiFu, Wei-Dong, Zhang Jun Chen; **Astragaloside IV protects against ischemic brain injury in a murine model of transient focal ischemia;** Neuroscience Letters Volume 363, Issue 3, 17 June 2004, Pages 218-223.
- (3)Sun Li, Liu Yingbei, Wang Ling, Chen Jing, Li Haiyan, Li Yan, Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Qingdao Medical College; **Effect of Astragalus Injection on Expression of BDNF in Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats;** World Chinese

Medicine; 2016-04

- (4) Encyclop Britannica- Structure And Function Of Photoreceptors :  
<https://www.britannica.com/>
- (5) Kandel, E. R.; Schwartz, J.H.; Jessell, T.M.; Principles of Neural Science (4th ed.) p. 507– 513.  
ISBN 0-8385-7701-6
- (6) Wikipedia : [https://en.wikipedia.org/wiki/Light-emitting\\_diode](https://en.wikipedia.org/wiki/Light-emitting_diode)
- (7) Makoto Bessho, Keiichi Shimizu; **Latest trends in LED lighting**; Electronics and Communication in Japan; 21 December 2011
- (8) 科技台灣 : <http://www.hightech.tw/index.php/2012-06-06-14-12-38/20-optical-electronics/84-semiconductor-lighting>
- (9) P N Youssef<sup>1</sup>, N Sheibani<sup>1</sup> and D M Albert<sup>1</sup> ; **Retinal light toxicity**; Eye(2011) 25, 1–14; 29 October 2010
- (10) Masataka Enoki, Saki Shinto, Yuta Matsuoka, Ayasa Otsuka, Sachiko Kaidzu, Masaki Tanito, Takahiro Shibata, Koji Uchida, Akihiro Ohira, Mayumi Yamato, Ken-ichi Yamada; **Lipid radicals cause light-induced retinal degeneration**; Chemical Communications; Issue 79, 2017
- (11) 神農氏 Shen-nong : <http://www.shen-nong.com/chi/herbal/huangqi.html>
- (12) 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
- (13) 医学百科 [http://big5.wiki8.com/huangqi\\_75403/](http://big5.wiki8.com/huangqi_75403/)
- (14) ChemFace, Astragaloside
- (15) Meili Lu, Futian Tang, Jing Zhang, Aina Luan, Meng Mei, Chonghua Xu, Suping Zhang, Hongxin Wang, Leonid N. Maslov; **Astragaloside IV Attenuates Injury Caused by Myocardial Ischemia/Reperfusion in Rats via Regulation of Toll-Like Receptor 4/Nuclear Factor- $\kappa$ B Signaling Pathway**; Phytotherapy Research, Volume 29, Issue 4 April 2015 Pages 599–606
- (16) Dingkun Gui, Jianhua Huang, Yongping Guo, Jianguo Chen, Yifang Chen, Wenzhen Xiao, Xusheng Liu, Niansong Wang; **Astragaloside IV ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats through inhibiting NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory genes expression**; Cytokine Volume 61, Issue 3, March 2013, Pages 970-977.
- (17) 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
- (18) Mei M, Tang F, Lu M, He X, Wang H, Hou X, Hu J, Xu C, Han R; **Astragaloside IV attenuates apoptosis of hypertrophic cardiomyocyte through inhibiting oxidative stress and calpain-1 activation** ; Environ Toxicol Pharmacol. 2015 Nov;40(3):764-73.