

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

高同半胱氨酸誘發視網膜病變後之視網膜幹細胞的再生分 化和動態變化分析 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2314-B-040-017-
執行期間：98年08月01日至99年07月31日
執行單位：中山醫學大學視光學系

計畫主持人：陳伯易
共同主持人：林培正

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 99年10月27日

前言：

視網膜內含有多層的神經細胞，組織為僅僅 0.5mm 的薄膜狀構造並排列在眼球的深部。視網膜的發育源自於前腦胚胎的神經上皮層，因此可視為大腦的一部分。成熟視網膜組織由 5 種視網膜神經元 (retinal neurons)，由外而內包含了五層細胞：感光細胞 (photoreceptor)、水平細胞(horizontal cell)、雙極細胞(bipolar cell)、無軸突細胞(amacrine cell)、以及神經節細胞(ganglion cell)，再加上米勒細胞 (Müller cells) 所構成。其中感光細胞 (photoreceptor) 是眼睛最重要的部分，它們對光作出錯綜複雜的反應與其他神經元執行第一個階段的影像處理後，神經訊息由神經節細胞(ganglion cell)彙整送入大腦做更進一步處理以形成視覺知覺。Müller cells，又稱為 Müller stem cells 擁有修補受傷視網膜神經細胞的能力(Fischer & Reh,2001 ; Reh & Fischer,2006 ; Vugler et al.,2007 ; Ohta et al.,2008)；視網膜組織一旦受傷，Müller stem cells 會被活化，表現出 GFAP 蛋白(Glial fibrillar acidic protein) (Stevens et al.,2003 ; Ooto et al.,2004 ; Karl et al.,2008)，為視網膜神經組織受損的指標。

同半胱氨酸 (homocysteine) 是一種胺基酸，它是人體甲硫氨酸(methionine)去甲基的產物；基因遺傳突變或營養代謝失調，會使「同半胱氨酸 (homocysteine)」大量的累積在體內，造成組織或細胞的毒性傷害 (Boldyrev AA et al.,2009; McCully KS et al.,2004)。許多臨床報告指出「高同半胱氨酸血症」與「視覺退化疾病」的罹患率有高度的關聯性 (Wright AD et al.,2008)，例如：(1)白內障 (cataract) (Sulochana KN et al.,2000; Presley GD et al.,1971; Shinohara T et al.,2006; S K Sen, et al.,2008)；(2) 水晶體異位(lens dislocation) (Cline JW et al.,1971)；(3)糖尿病視網膜病變 (diabetic retinopathy) (Coral K et al.,2009 ; Aydemir O.,2008; Brazionis L et al.,2008)；(4)糖尿病性視網膜黃斑部水腫(macular edema)(Aydin E et al.,2008)；(5)老年性黃斑部退化(age-related macular degeneration) (Rochtchina E et al.,2007 ; Seddon JM.,2006; Seddon JM et al.,2008)；(6)視網膜血管阻塞 (retinal vascular occlusion) (Sottilotta G et al.,2007 ; Pinna A et al.,2006; Yaghoubi GH et al.,2004)；(7)青光眼 (glaucoma) (Clement CI et al.,2009 ; Roedl JB et al.,2008)。

若體內缺乏維生素 B6/B12、葉酸(folate)等必要的營養素，會引起「同半胱氨酸 (homocysteine)」濃度上升；並且提高神經退化性疾病的高罹患率 (Mattson & Shea,2003 ; Sachdev,2005)。過去的研究指出，在人類的視網膜組織中，「同半胱氨酸 (homocysteine)」會聚集堆積在感光細胞 (photoreceptor) 的突觸 (synapses) 和 Müller stem cells 的細胞體中 (Davanger et al.,1994)。「同半胱氨酸 (homocysteine)」的過度堆積與視網膜退化性疾病 (Degenerative Retinal Disease) 的罹患率亦有高度的相關性 (Wright et al.,2008)。視覺的損失難以恢復，通常為不可逆；一旦又繼續加深惡化，最後容易造成失明。但是，對於「同半胱氨酸 (homocysteine)」大量的堆積在視網膜組織中，是否會造成神經的傷害？是否會活化 Müller stem cells？或會限制 Müller stem cells 的再生分化功能？目前沒有明確的研究報告。

研究目的：

視網膜退化疾病在臨床上有逐年增加的趨勢，即使以接受了治療，視覺恢復的結果並不理想，況且目前乃無特效藥。尋找更好的保健方法與治療方式迫在眉睫；然而，目前並無直接的實驗證據指出「視網膜退化性病變(degenerative retinal disease)」是由「同半胱氨酸

酸(homocysteine)」在眼球內異常蓄積所造成。因此我們認為以下問題值得進一步的追蹤研究：在眼球中「同半胱氨酸 (homocysteine)」的蓄積；(1)是否會造成視網膜神經組織的傷害？傷害的程度與同半胱氨酸蓄積的濃度(量) 是否有相關性。(2) Müller stem cells 的活化(GFAP 蛋白的表現)是否與同半胱氨酸蓄積的濃度(量)有相關性？本研究主要從組織細胞病理學觀點切入，探討「同半胱氨酸」對 Müller stem cells 的活化、增生、移動與動態分化過程的衝擊效應，並且追蹤評估視網膜細胞再生與修補復原的程度與 Müller stem cells 的動態變化。

文獻探討：

Mouse 或 Rat 動物實驗報告指出-「同半胱氨酸 (homocysteine)」會造成眼球視網膜神經節細胞(retinal ganglion cells)的損傷、退化或死亡 (Moore et al.,2001; Martin et al.,2004; Viktorov et al.,2006; Lee et al.,2007)；刺激血管生長因子在視網膜的異常表現(vascular endothelial growth factor) (Lee et al.,2007)。尤其在體外組織培養實驗 (organotypic roller cultures)，指出「同半胱氨酸」對視網膜的傷害可深入視網膜組織的外顆粒層 (out nuclear layer; ONL) 和內顆粒層 (inner nuclear layer; INL) (Viktorov et al.,2006)。視網膜神經細胞突觸會表現 N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA receptor)來維持正常視覺神經訊息迴路的傳遞 (Shen et al.,2006; Wang et al.,2008)；另外，「同半胱氨酸 (homocysteine)」分子相似於「NMDA」分子，兩者皆能與 Glutamate 分子做競爭性地與 NMDA receptor 結合，並會干擾下游訊息的表現 (Ziemińska et al.,2003)。在 Müller stem cells 細胞培養實驗指出「NMDA」與「NMDA receptor」結合活化後會造成細胞基因表現的改變 (Chavira-Suárez et al.,2008)；因此，可能造成子代細胞族群分化的改變。

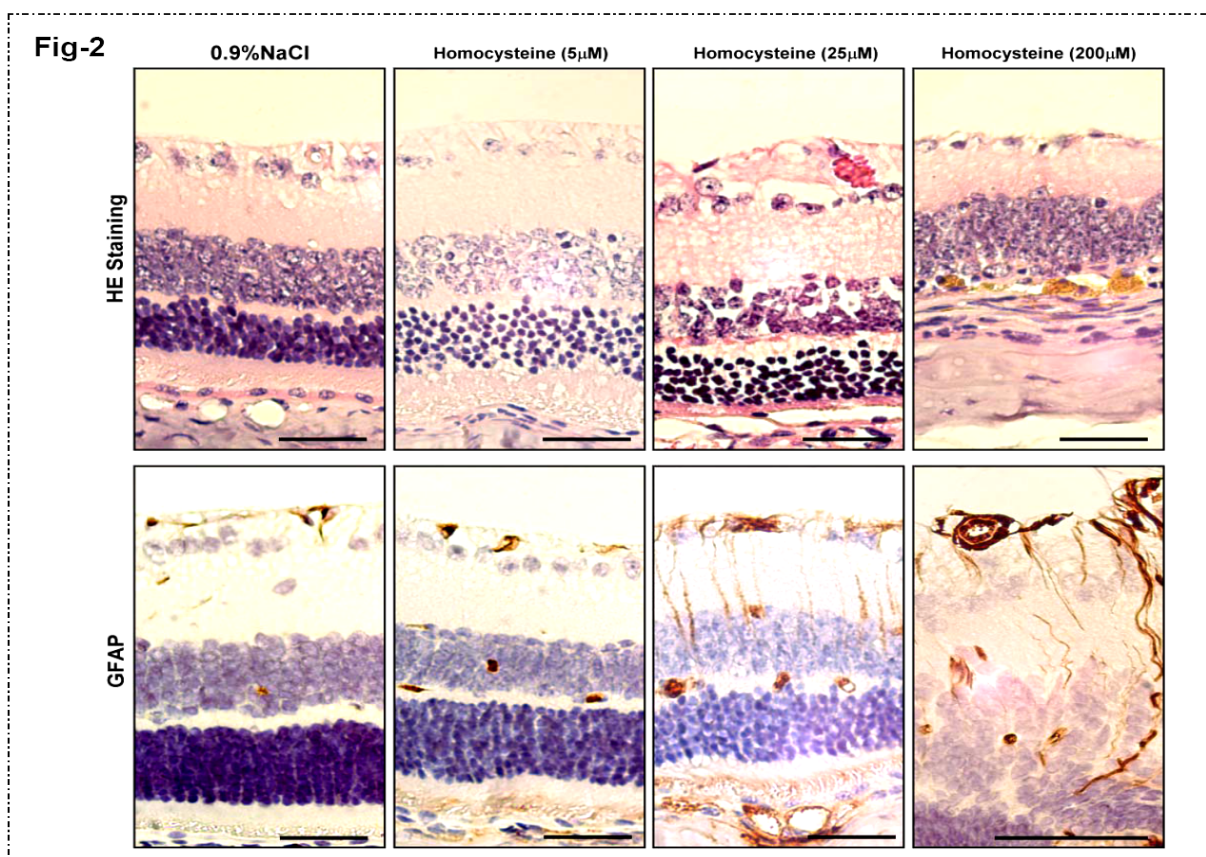
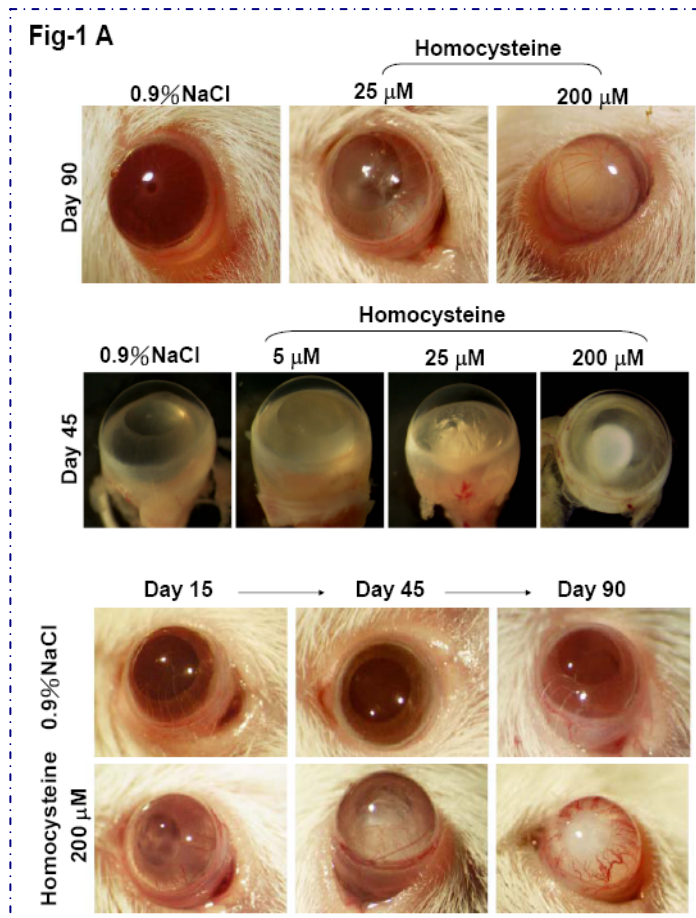
研究方法：

實驗材料與方法：

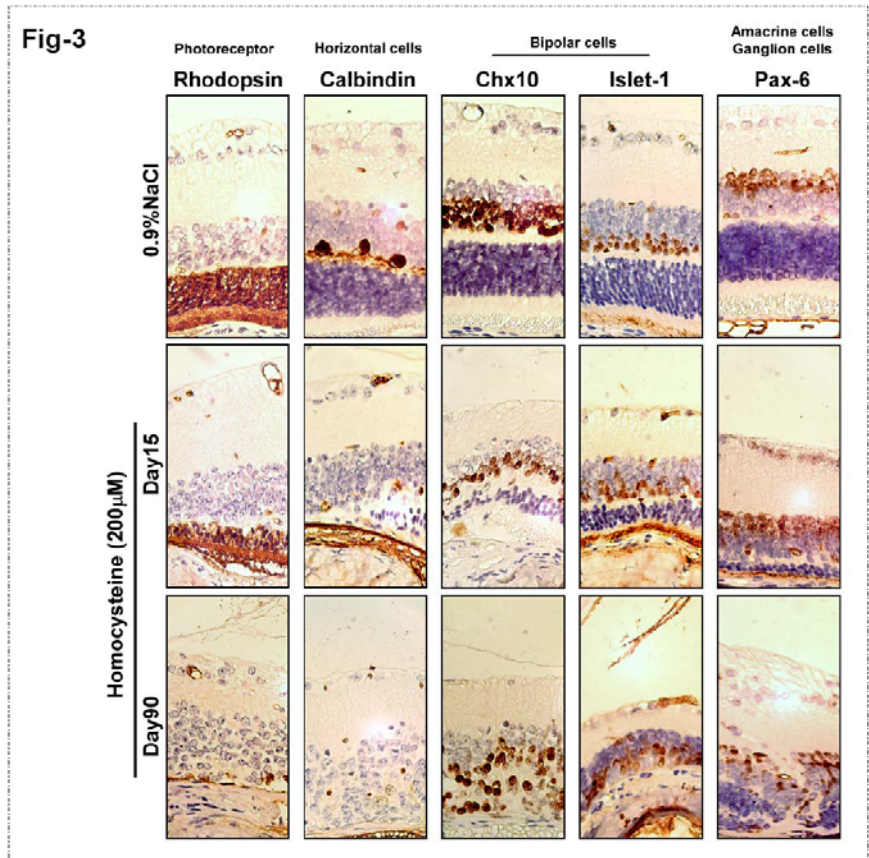
- (1) 實驗動物:實驗動物採用 8 週齡之 C57bL6xCBA 之 F1 公鼠,控制組(n=20)和實驗組(n=80) 餵予正常飼料與飲水。麻醉小鼠,控制組以眼球注射 (intraocular injection) 0.5 μ l 的「0.9 %NaCl (PH=7.0)」;控制組以眼球注射 0.5 μ l 的「同半胱氨酸 (homocysteine)(PH=7.0)」最後在每個眼球 (體積約 25 μ l) 內濃度分別到達 5 microM、25 microM 與 200 microM。
- (2) 組織病理分析:犧牲小鼠摘取眼球組織,浸泡於 10%中性福馬林固定液中。組織固定後則進行脫水、石蠟包埋、切片(4~5 μ m)並以蘇木紫-伊紅染色,比較各組別間視網膜組織細胞病理型態之改變。
- (3) 組織免疫化學染色:組織脫蠟以檸檬酸緩衝溶液(citrate buffer)加熱 100°C 活化抗原結合部位,並且浸泡過氧化氫去除干擾,再以阻斷劑(blocking buffer)去除非特异性反應背景,之後使用專一性抗體與抗原結合,觀察細胞上特定抗原的表現。分別以 Pax6、Chx10、Islet1、Rhodopsin、Calbindin、GFAP 和 Chx10 作為判斷視網膜神經退化與再生之指標,以 PCNA 標定異常增生細胞、以 TUNEL assay 判斷細胞凋亡。並在光學顯微鏡下觀察其細胞性質定位,且利用圖像分析儀拍照進行細胞原位定量測定。

結果與討論：

- (1) 以小鼠實驗模式，採用眼球注射 (intraocular injection) 「同半胱胺酸 (homocysteine)」，最終濃度分別給為 5 microM、25 microM 與 200 microM；在第 15 天，45 天與 90 天後發現「白內障 (Cataract) 病變」【Fig-1】和嚴重的「視網膜神經退化」的產生【Fig-2】。
- (2) 相較於對照組，注射 0.9%NaCl 小鼠眼球呈現正常外觀與組織形態【Fig-2】；「同半胱胺酸 (homocysteine)」濃度越高，視網膜組織退化的程度越嚴重。Müller stem cells 的活化(GFAP 蛋白的表現)與同半胱胺酸 (homocysteine) 蓄積的濃度 (量)有正相關性【Fig-2】。



- (3) 在 200 μ M 的同半胱氨酸 (homocysteine) 處理後第 15 天和第 90 天的視網膜組織中，表現 Rhodopsin 但蛋白的感光細胞 (photoreceptor) 和表現 Calbindin 的水平細胞 (horizontal cell) 的數目有明顯的減少；細胞退化的程度比雙極細胞 (bipolar cell) 和無軸突細胞 (amacrine cell) 嚴重【Fig-3】。



結論與建議：

- (1) 在 200 μ M 的同半胱氨酸 (homocysteine) 處理後，經免疫染色指出表現 Rhodopsin 的感光細胞 (photoreceptor)、表現 Calbindin 的水平細胞 (horizontal cells)、表現 Chx10 和 Islet1 的雙極細胞 (bipolar cells) 和表現 Pax-6 的無軸突細胞 (amacrine cells)。結果指出在第 15 天，及可發現視網膜組織的退化；在第 90 天的組織，顯示退化的感光細胞 (photoreceptor) 和表水平細胞 (horizontal cell) 層，並無明顯的修復【Fig-3】；實驗有別於 Müller stem cells 的活化 (GFAP 蛋白的表現)【Fig-2】。因此，推測同半胱氨酸 (homocysteine) 可能會阻礙 Müller stem cells 的再生分化。
- (2) 我們認為延遲或減緩視覺退化疾病的發生，在於是否能有效的保持視網膜幹細胞的完整功能，如：Müller stem cells。因此，「同半胱氨酸 (homocysteine)」在複雜的視覺退化歷程中，尤其對於 Müller stem cells 有許多關鍵性的問題需進一步釐清。本計畫能提供明確的證據，可作為「預防」與「治療」視覺退化疾病的指導方針；對於確認「同半胱氨酸 (homocysteine)」在視覺退化過程的「傷害角色」，同時對於 Müller stem cells 的「動態分化分析」與「視覺再生工程」的未來應用提供良好的研究基礎，有助於於將來推動-視覺保健教育、醫藥生技和幹細胞工程的開發。
- (3) 以小鼠實驗模式中，意外的發現同半胱氨酸 (homocysteine) 會造成白內障 (cataract) 有的發生。經文獻收尋發現相關報告：在人體中，同半胱氨酸 (homocysteine) 的高度表現與老年性白內障 (senile cataract) 的發生率有密切的關係 (S K Sen, et al., 2008)。同時患有高胱氨酸尿症 (hyperhomocystinuria) 的新生兒容易有先天性白內障 (congenital cataract) 的病變 (Sulochana KN et al., 2000; Presley GD et al., 1971)。然而，目前並無直接的實驗證據指出「白內

障(cataract)」的病變是由「同半胱胺酸(homocysteine)」在水晶體異常蓄積所造成。因此我們認為此問題值得進一步的追蹤研究。

計畫成果自評：

本計畫已達成初步的目標。本計畫讓我們對於同半胱胺酸(homocysteine)在影響視網膜退化的過程有了近一步的了解。雖然實驗室中，小鼠視網膜的退化仍然無法完全代表臨床上患者之視網膜退化，藉著本計畫我們也對小鼠視覺退化模式與 Müller stem cells，視網膜幹細胞再生分化的觀察分析與研究技術有了很大的磨練，並獲得了許多寶貴的經驗。並且，在此計畫執行中有了特殊的發現：同半胱胺酸(homocysteine)亦會造成白內障(cataract)有的發生。具有臨床意義，值得進一步的追蹤研究。

參考文獻：

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.

Aydemir O, Turkuoglu P, Guler M, Celiker U, Ustundag B, Yilmaz T, et al. Plasma and vitreous homocysteine concentrations in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Retina* 2008; 28(5):741-3.

Aydin E, Demir HD, Ozyurt H, Etikan I. Association of plasma homocysteine and macular edema in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Ophthalmol* 2008; 18(2):226-32.

Boldyrev AA. Molecular mechanisms of homocysteine toxicity. *Biochemistry (Mosc)* 2009; 74(6):589-98.

Brazionis L, Rowley K, Sr., Itsiopoulos C, Harper CA, O'Dea K. Homocysteine and diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2008; 31(1):50-6.

Chavira-Suárez E, Ramírez M, Lamas M. D-Serine/N-methyl-D-aspartate receptor signaling decreases DNA-binding activity of the transcriptional repressor DREAM in Müller glia from the retina. *Neurosci Lett.* 2008 Feb 20;432(2):121-6.

Clement CI, Goldberg I, Healey PR, Graham SL. Plasma homocysteine, MTHFR gene mutation, and open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 2009; 18(1):73-8.

Cline JW, Goyer RA, Lipton J, Mason RG. Adult homocystinuria with ectopia lentis. *South Med J* 1971; 64(5):613-7.

Coral K, Angayarkanni N, Gomathy N, Bharathselvi M, Pukhraj R, Rupak R. Homocysteine levels in the vitreous of proliferative diabetic retinopathy and rhegmatogenous retinal detachment: its modulating role on lysyl oxidase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(8):3607-12.

Davanger S, Torp R, Ottersen OP. Co-localization of glutamate and homocysteic acid immunoreactivities in human photoreceptor terminals. *Neuroscience*. 1994 Nov;63(1):123-33.

Karl MO, Hayes S, Nelson BR, Tan K, Buckingham B, Reh TA. Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci*. 2008 Dec 9;105(49):19508-13.

Lee I, Lee H, Kim JM, Chae EH, Kim SJ, Chang N. Short-term hyperhomocysteinemia-induced oxidative stress activates retinal glial cells and increases vascular endothelial growth factor expression in rat retina. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007 May;71(5):1203-10.

Martin PM, Ola MS, Agarwal N, Ganapathy V, Smith SB. The sigma receptor ligand (+)-pentazocine prevents apoptotic retinal ganglion cell death induced in vitro by homocysteine and glutamate. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004 Apr 7;123(1-2):66-75.

Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*. 2003 Mar;26(3):137-46.

McCully KS. Homocysteine, vitamins, and prevention of vascular disease. *Mil Med* 2004; 169(4):325-9.

Moore P, El-sherbeny A, Roon P, Schoenlein PV, Ganapathy V, Smith SB. Apoptotic cell death in the mouse retinal ganglion cell layer is induced in vivo by the excitatory amino acid homocysteine. *Exp Eye Res*. 2001 Jul;73(1):45-57.

Ohta K, Ito A, Tanaka H. Neuronal stem/progenitor cells in the vertebrate eye. *Dev Growth Differ*. 2008 May;50(4):253-9.

Ooto S, Akagi T, Kageyama R, Akita J, Mandai M, Honda Y, Takahashi M. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci*. 2004 Sep 14;101(37):13654-9.

Pinna A, Carru C, Zinellu A, Dore S, Deiana L, Carta F. Plasma homocysteine and cysteine levels in retinal vein occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(9):4067-71.

Presley GD, Sidbury JB. Homocystinuria and ocular defects. *Am J Ophthalmol* 1967; 63(6):1. Acquired cataract in homocystinuria. *Indian J Ophthalmol* 1971; 19(2):49-5723-7.

Rochtchina E, Wang JJ, Flood VM, Mitchell P. Elevated serum homocysteine, low serum vitamin B12, folate, and age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Am J Ophthalmol* 2007; 143(2):344-6.

Roedl JB, Bleich S, Schlotzer-Schrehardt U, von Ahsen N, Kornhuber J, Naumann GO, et al. Increased homocysteine levels in tear fluid of patients with primary open-angle glaucoma.

Ophthalmic Res 2008; 40(5):249-56.

S K Sen, Pukazhvanthen P, Abraham R. Plasma homocysteine, folate and vitamin B12 levels in senile cataract. Indian Journal of Clinical Biochemistry 2008; 23(3):255-7.

Sachdev PS. Homocysteine and brain atrophy. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2005 Sep;29(7):1152-61.

Seddon JM, Gensler G, Klein ML, Milton RC. C-reactive protein and homocysteine are associated with dietary and behavioral risk factors for age-related macular degeneration. Nutrition 2006; 22(4):441-3.

Seddon JM, Gensler G, Klein ML, Milton RC. Evaluation of plasma homocysteine and risk of age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol 2006; 141(1):201-3.

Shen Y, Liu XL, Yang XL. N-methyl-D-aspartate receptors in the retina. Mol Neurobiol. 2006 Dec;34(3):163-79.

Shinohara T, Ikesugi K, Mulhern ML. Cataracts: role of the unfolded protein response. Med Hypotheses 2006; 66(2):365-70.

Sottilotta G, Oriana V, Latella C, Luise F, Piromalli A, Ramirez F, et al. Role of hyperhomocystinemia in retinal vascular occlusive disease. Clin Appl Thromb Hemost 2007; 13(1):104-7.

Stevens ER, Esguerra M, Kim PM, Newman EA, Snyder SH, Zahs KR, Miller RF. D-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors. Proc Natl Acad Sci. 2003 May 27;100(11):6789-94.

Sulochana KN, Amirthalakshmi S, Vasanthi SB, Tamilselvi R, Ramakrishnan S. Homocystinuria with congenital/developmental cataract. Indian J Pediatr 2000; 67(10):725-8.

Viktorov IV, Aleksandrova OP, Alekseeva NY. Homocysteine toxicity in organotypic cultures of rat retina. Bull Exp Biol Med. 2006 Apr;141(4):471-4.

Vugler A, Lawrence J, Walsh J, Carr A, Gias C, Semo M, Ahmado A, da Cruz L, Andrews P, Coffey P. Embryonic stem cells and retinal repair. Mech Dev. 2007 Nov-Dec;124(11-12):807-29.

Wang XL, Jiang XD, Liang PJ. Intracellular calcium concentration changes initiated by N-methyl-D-aspartic acid receptors in retinal horizontal cells. Neuroreport. 2008 Apr 16;19(6):675-8.

Wright AD, Martin N, Dodson PM. Homocysteine, folates, and the eye. Eye. 2008 Aug;22(8):989-93.

Wright AD, Martin N, Dodson PM. Homocysteine, folates, and the eye. *Eye (Lond)* 2008; 22(8):989-93.

Yaghoubi GH, Madarshahian F, Mosavi M. Hyperhomocysteinaemia: risk of retinal vascular occlusion. *East Mediterr Health J* 2004; 10(4-5):633-9.

Ziemińska E, Stafiej A, Łazarewicz JW. Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurones. *Neurochem Int.* 2003 Sep-Oct;43(4-5):481-92.

Reh TA, Fischer AJ. Retinal stem cells. *Methods Enzymol.* 2006;419:52-73.

無研發成果推廣資料

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：陳伯易		計畫編號：98-2314-B-040-017-					
計畫名稱：高同半胱胺酸誘發視網膜病變後之視網膜幹細胞的再生分化和動態變化分析							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

本計畫已達成初步的目標。本計畫讓我們對於同半胱氨酸(homocysteine)在影響視網膜退化的過程有了近一步的了解。雖然實驗室中，小鼠視網膜的退化仍然無法完全代表臨床上患者之視網膜退化，藉著本計畫我們也對小鼠視覺退化模式與 Müller stem cells，視網膜幹細胞再生分化的觀察分析與研究技術有了很好的磨練，並獲得了許多寶貴的經驗。並且，在此計畫執行中有了特殊的發現：同半胱氨酸(homocysteine)亦會造成白內障(cataract)有的發生。具有臨床意義，值得進一步的追蹤研究。