

科技部補助專題研究計畫報告

探討真菌衍生之抗神經發炎成分及其對視網膜疾病之療效評估 (第3年)

報告類別：成果報告
計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 107-2320-B-038-025-MY3
執行期間：109年08月01日至110年07月31日
執行單位：臺北醫學大學藥理學科

計畫主持人：蕭哲志
共同主持人：李宗徽

計畫參與人員：碩士級-專任助理：顏敬倫
碩士級-專任助理：陳俐卉
博士班研究生-兼任助理：吳亮寰

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)
本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

中華民國 110 年 11 月 07 日

中文摘要：本計畫第三年進行真菌衍生物的藥理活性評估，更進一步針對視網膜疾病青光眼與藍光損傷，加以研究真菌成分其療效作用與機制。青光眼(glaucoma)是一種眼內壓升高導致視網膜節神經元細胞(retinal ganglion cell)損傷與神經性發炎的神經退化性疾病，在此病程中可導致視網膜穆勒(retinal Müller cells)與小神經膠細胞(microglia)的異常活化而進一步惡化視網膜毀損。視網膜膠細胞及小神經膠細胞異常活化及神經性發炎被證實是導致視網膜退化的重要原因。特別是基質金屬蛋白酵素(MMP-9)及一氧化氮合成酶均參與在青光眼及藍光造成的視網膜損傷。本年度計畫重點在於以篩選之真菌成分，其中探討桑黃(Phellinus lintens)之活性成分3,4-dihydroxybenzalacetone (DBL)減緩視網膜膠細胞活化及改善視網膜退化疾病等功能及機制。根據細胞研究發現，DBL在TNF-刺激的視網膜穆勒細胞(retinal Muller cell, rMC-1)中顯著且依濃度梯度抑制基質金屬蛋白酶(MMP-9)的gelatinolysis活性及其蛋白表現。在訊息研究中，DBL顯著抑制穆勒細胞中TNF-活化的STAT與ERK活化路徑，但不影響NF- κ B相關活化。特別地，LPS活化小神經膠細胞之培養液(conditioned medium)所造成的穆勒細胞gelatinolysis活化，可受DBL依濃度效應而壓制。另一方面，DBL在TRL-4 ligand (LPS)活化的小神經膠細胞中顯著且依濃度效應抑制一氧化氮(NO)及活性氧屬(ROS)的產生，同時也減低iNOS蛋白的表現。一致性的實驗發現，DBL明顯抑制小神經膠細胞在STAT的磷酸化及其活化反應。在視網膜功能評估研究上，活體高眼壓導致之異常的視網膜電圖(ERG)及藍光導致之瞳孔光反應均能有所改善。同樣地，DBL也能改善高眼壓所導致的眼房液MMP-9活性及視網膜組織MMP-9蛋白表現。綜合上述研究成果顯示，真菌成分DBL主要可通過緩解STAT訊息路徑而改善視網膜神經發炎及MMP-9表現。藉由改善視網膜穆勒細胞及小神經膠細胞之異常活化，DBL可具有潛在在緩解青光眼及藍光損傷之保護療效。

中文關鍵詞：青光眼、藍光、DBL、視網膜穆勒細胞、基質金屬蛋白酵素、STAT、小神經膠細胞、一氧化氮合成酶、視網膜電生理、瞳孔光反應

英文摘要：The third year of this project was focused on the screen and pharmacological evaluation of bioactive fungal compounds on the retinal diseases. Furthermore, the therapeutic profiles of these fungal derivatives were studied on the retinal injuries of glaucoma in vivo. Retinal glial activation and neuroinflammation have been confirmed to cause the devastating responses in the retinodegenerative diseases. The expression and activation of matrix metalloproteinase (MMP)-9 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) could be exerted as the crucial pathological factors in glaucoma- and blue light-induced retinal injuries. The present study aimed to investigate the retinoprotective effects and mechanisms of fungal ingredient 3,4-dihydroxybenzalacetone (DBL) isolated from *Phellinus linteus* in the retinal glial activation and retinodegenerative animal models. According to the cellular

studies, DBL significantly and concentration-dependently abrogated MMP-9 activation and expression in TNF-stimulated retinal Müller (rMC-1) cells. We found the inhibitory activities of DBL were strongly through the STAT- and ERK-dependent pathways. Furthermore, DBL dramatically attenuated MMP-9 activation in the stimulated Müller cells exposed to conditioned media from LPS-stimulated microglia BV-2 cells. On the other hand, DBL strongly suppressed LPS-induced production of NO and ROS, and expression of iNOS in microglia BV-2 cells. Consistently, the phosphorylation of STAT was substantially blocked by DBL in LPS-stimulated microglia BV-2 cells. In the evaluation of retinoprotective functions, the high IOP-induced scotopic electroretinographic (ERG) deficit and blue light-induced abnormal pupillary light response (PLR) were assessed. The deficit scotopic ERG responses markedly recovered by DBL in a rat model of glaucoma-like ischemia/reperfusion (I/R)-injury. DBL also reduced the aqueous gelatinolytic activity and retinal MMP-9 expression in high IOP-injured conditions. Additionally, DBL could restore the abnormal PLR and reduce retinal MMP-9 activation. In summary, DBL could ameliorate retinal neuroinflammation and MMP-9 activation by predominantly inhibiting STAT3 activation in the retinal Müller cells and microglia, which exhibits therapeutic potential for glaucoma and other retinal degenerative diseases.

英文關鍵詞：Glaucoma, Blue light, DBL, Retinal Müller cell, MMP-9, STAT, Microglia, iNOS, ERG, PLR

科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

探討真菌衍生之抗神經發炎成分及其對視網膜疾病之療效評估

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫 (中醫藥學門)

計畫編號：MOST 107-2320-B-038-025-MY3

總執行期間：107 年 8 月 1 日至 110 年 7 月 31 日

本年度執行期間：109 年 8 月 1 日至 110 年 7 月 31 日

執行機構及系所：臺北醫學大學醫學院醫學系藥理學科

計畫主持人：蕭哲志 教授

計畫參與人員：碩士級助理：顏敬倫、陳俐卉；博士生：吳亮寰

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現： 否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，_____ (請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送)

中 華 民 國 110 年 11 月 2 日

科技部補助專題研究計畫成果報告

探討真菌衍生之抗神經發炎成分及其對視網膜疾病之療效評估

The investigation of anti-neuroinflammatory constituents from fungal species and their protective profiles in the retinal diseases

計畫編號：MOST 107-2320-B-038-025-MY3

總執行期限：107年8月1日至110年7月31日

本年度執行期間：109年8月1日至110年7月31日

主持人：蕭哲志 臺北醫學大學醫學院醫學系藥理學科

計畫參與人員：碩士級助理：顏敬倫、陳俐卉；博士生：吳亮寰

一、中文摘要

本計畫第三年進行真菌衍生物的藥理活性評估，更進一步針對視網膜疾病青光眼與藍光損傷，加以研究真菌成分其療效作用與機制。青光眼(glaucoma)是一種眼內壓升高導致視網膜節神經元細胞(retinal ganglion cell)損傷與神經性發炎的神經退化性疾病，在此病程中可導致視網膜穆勒(retinal Müller cells)與小神經膠細胞(microglia)的異常活化而進一步惡化視網膜毀損。視網膜膠細胞及小神經膠細胞異常活化及神經性發炎被證實是導致視網膜退化的重要原因。特別是基質金屬蛋白酵素 (MMP-9) 及一氧化氮合成酶均參與在青光眼及藍光造成的視網膜損傷。本年度計畫重點在於以篩選之真菌成分，其中探討桑黃 (*Phellinus lintens*)之活性成分 3,4-dihydroxybenzalacetone (DBL)減緩視網膜膠細胞活化及改善視網膜退化疾病等功能及機制。根據細胞研究發現，DBL 在 TNF- α 刺激的視網膜穆勒細胞 (retinal Muller cell, rMC-1)中顯著且依濃度梯度抑制基質金屬蛋白酶 (MMP-9)的 gelatinolysis 活性及其蛋白表現。在訊息研究中，DBL 顯著抑制穆勒細胞中 TNF- α 活化的 STAT 與 ERK 活化路徑，但不影響 NF- κ B 相關活化。特別地，LPS 活化小神經膠細胞之培養液(conditioned medium)所造成的穆勒細胞 gelatinolysis 活化，可受 DBL 依濃度效應而壓制。另一方面，DBL 在 TLR-4 ligand (LPS)活化的小神經膠細胞中顯著且依濃度效應抑制一氧化氮(NO)及活性氧屬(ROS)的產生，同時也減低 iNOS 蛋白的表現。一致性的實驗發現，DBL 明顯抑制小神經膠細胞在 STAT 的磷酸化及其活化反應。在視網膜功能評估研究上，活體高眼壓導致之異常的視網膜電圖(ERG)及藍光導致之瞳孔光反應均能有所改善。同樣地，DBL 也能改善高眼壓所導致的眼房液 MMP-9 活性及視網膜組織 MMP-9 蛋白表現。綜合上述研究成果顯示，真菌成分 DBL 主要可通過緩解 STAT 訊息路徑而改善視網膜神經發炎及 MMP-9 表現。藉由改善視網膜穆勒細胞及小神經膠細胞之異常活化，DBL 可具有潛力在緩解青光眼及藍光損傷之保護療效。

關鍵詞：青光眼、藍光、DBL、視網膜穆勒細胞、基質金屬蛋白酵素、STAT、小神經膠細胞、一氧化氮合成酶、視網膜電生理、瞳孔光反應

Abstract

The third year of this project was focused on the screen and pharmacological evaluation of bioactive fungal compounds on the retinal diseases. Furthermore, the therapeutic profiles of these fungal derivatives were studied on the retinal injuries of glaucoma *in vivo*. Retina glial activation and neuroinflammation have been confirmed to cause the devastating responses in the retinodegenerative diseases. The expression and activation of matrix metalloproteinase (MMP)-9 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) could be exerted as the crucial pathological factors in glaucoma- and blue light-induced retinal injuries. The present study aimed to investigate the retinoprotective effects and mechanisms of fungal ingredient 3,4-dihydroxybenzalacetone (DBL) isolated from *Phellinus linteus* in the retinal glial activation and retinodegenerative animal models. According to the cellular studies, DBL significantly and concentration-dependently abrogated MMP-9 activation and expression in TNF α -stimulated retinal Müller (rMC-1) cells. We found the inhibitory activities of DBL were strongly through the STAT- and ERK-dependent pathways. Furthermore, DBL dramatically attenuated MMP-9 activation in the stimulated Müller cells exposed to conditioned media from LPS-stimulated microglia BV-2 cells. On the other hand, DBL strongly suppressed LPS-induced production of NO and ROS, and expression of iNOS in microglia BV-2 cells. Consistently, the phosphorylation of STAT was substantially blocked by DBL in LPS-stimulated microglia BV-2 cells. In the evaluation of retinoprotective functions, the high IOP-induced scotopic electroretinographic (ERG) deficit and blue light-induced abnormal pupillary light response (PLR) were assessed. The deficit scotopic ERG responses markedly recovered by DBL in a rat model of glaucoma-like ischemia/reperfusion (I/R)-injury. DBL also reduced the aqueous gelatinolytic activity and retinal MMP-9 expression in high IOP-injured conditions. Additionally, DBL could restore the abnormal PLR and reduce retinal MMP-9 activation. In summary, DBL could ameliorate retinal neuroinflammation and MMP-9 activation by predominantly inhibiting STAT3 activation in the retinal Müller cells and microglia, which exhibits therapeutic potential for glaucoma and other retinal degenerative diseases.

Keywords: Glaucoma, Blue light, DBL, Retinal Müller cell, MMP-9, STAT, Microglia, iNOS, ERG, PLR

二、緣由與目的

青光眼是一種由諸多病因造成的退化性疾病，其共同特徵是視神經乳頭凹陷(cupping of the optic nerve head)和視野受損(visual-field damage)，這些現象通常是因眼壓過高而引起(Weinreb et al., 2004)，並以進行式造成視神經萎縮和視網膜神經節細胞(RGC)之細胞凋亡為特徵。根據統計，青光眼已成為導致不可逆性失明的最常見原因之一(Quigley et al., 2005)。從病理機制和治療的角度來看，眼壓(intraocular pressure, IOP)是主要的危險因子也是重要的治療標的(Hollands et al., 2013)。這種關聯顯示，青光眼的眼內壓可能會藉由升高視神經頭的壓力敏感性造成視神經損害(Weinreb et al., 2004)。所有類型青光眼的共同特徵是視網膜神經節細胞(retinal ganglion cell, RGC)丟失、視網膜神經纖維層(retinal nerve fibre layer, NFL)變薄和視盤凹陷(cupping of optic disc)。根據前房角(iridocorneal angle)的形態，青光眼可分為開角型青光眼(open-angle glaucoma, OAG)和閉角型青光眼(angle-closure glaucoma, ACG)。前房角包含 Schlemm 氏管(Schlemm's canal)，該管位於周圍的角膜(cornea)和虹膜(iris)之間；而房水(aqueous humor)正是由 Schlemm 氏管流出離開眼睛 (Weinreb et al., 2014)。在許多青光眼患者中，眼內壓僅略有增加或在正常範圍內，並且壓力升高可能是無痛的(Sommer, 1999)，因此在主要症狀出現之前及早診斷發現很重要。

目前降低青光眼性視神經病變(glaucomatous optic neuropathy)持續退化與惡化的有效方法在於降低眼內壓。眼壓的降低可藉由藥物治療、激光治療或外科手術完成，可將眼內壓(IOP)降低至預設的目標水平之下，讓患者的青光眼性視神經損害停止進一步的發展。根據美國眼科學會(American Academy of Ophthalmology, AAO)的治療指引，前列腺素類似物(Prostaglandin analogues)是一線治療藥物，如 Atanoprost 和 Tafluprost 可通過改善葡萄膜鞏膜流出(Uveoscleral outflow)降低眼壓(Stein et al., 2008)。而前列腺素類似物的替代藥物是 β 腎上腺素阻斷劑(β -adrenergic blockers)，如 Timolol 和 Betaxolol 可通過減少房水產生來降低眼內壓(Sambhara et al., 2014)。其他藥物包括局部碳酸酐酶抑制劑(Carbonic anhydrase inhibitors, CAI)，如 Dorzolamide 和 Brinzolamide 可減少房水的產生 (Van et al., 2005)。 α 腎上腺素致效劑(α -adrenergic agonists)如 Brimonidine 可減少房水的產生並增加葡萄膜鞏膜的流出(Nguyen et al., 2014)。縮瞳劑(Miotics)的使用歷史最長，如 Pilocarpine 可通過改善房水由小樑網狀組織(trabecular meshwork)流出而降低眼內壓(McLaren et al., 2003)。而最新型的藥物是 Rho kinase inhibitors (如 Ripasudil)，這類藥物能增加小樑網狀組織的流出量並減少眼房水的產生(Tanihara et al., 2016)，其主要副作用是結膜充血(conjunctival hyperemia)，約有 70% 的患者在使用 ripasudil 持續 8 週或更長時間後發生結膜充血的情形。除了上述臨床使用藥物，近年對於青光眼視神經保護的藥物研究也愈來愈受到重視(Sigireddi et al., 2018)，主要策略是防止視網膜神經節細胞(RGC)發生細胞凋亡或數量減少(He et al., 2018)，因為視網膜神經節細胞層(GCL)為青光眼疾病中主要受損的細胞層之一。此外，開發基因療法也運用於青光眼的治療，由此可見現今青光眼療法仍未滿足治療需求。

Toll-like receptors (TLRs) 屬於一系列能識別並響應各種微生物特徵(如 pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)和內源性配體(如 damage associated molecules patterns, DAMPs) 的接受體 (Kawasaki & Kawai., 2014)。TLR 活化後，MyD88 被牽引到 TIR 區域，從而導致 NF- κ B 途徑和 MAPK 途徑被活化。此外，TLR4 還可以通過 TRIF 訊息途徑激活 1 型干擾素 (type 1 interferon) 反應 (Kagan et al., 2008)。許多的證據顯示，在視網膜缺血性疾病 (retinal ischemic diseases)，包括缺血再灌注損傷 (ischemia-reperfusion injury)、青光眼 (glaucoma)、糖尿病性視網膜病 (diabetic retinopathy, DR) 和早產兒視網膜病變

(retinopathy of prematurity, ROP)，在上述這些眼科疾病中的視網膜 TLRs 表達會受到調節而變化 (Xu & Wang, 2016)。TLR 在視網膜的多種細胞中都有表達，例如視網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) (Hooks et al., 2008)、神經膠質細胞 (glial cells) (Ko et al., 2011)、感光細胞 (photoreceptor cells) (Ko et al., 2011) 和內皮細胞 (endothelium cells) (Stewart et al., 2015)。視網膜中 TLR 的活化會啟動一連串複雜的訊息路徑，誘導炎性細胞因子的產生並調節共刺激分子 (co-stimulatory molecules) 的水平，在視網膜缺血性疾病的病理機制中起著重要作用 (Dvorianchikova et al., 2010)。在青光眼患者的視網膜中，TLR2、TLR3 和 TLR4 的表達會上升，在小神經膠質細胞 (microglia cells) 中可明顯檢測到 TLR2 和 TLR4 的表達 (Luo et al., 2010)。而 TLR4 可調節包括青光眼在內的神經炎性疾病，並參與神經退行性疾病和中樞神經系統損傷中的小神經膠質細胞的活化 (Lehnardt et al., 2003; Qin et al., 2005; Fernandez-Lizarbe et al., 2009)。另在大鼠視網膜神經膠質細胞和的研究表明，青光眼視網膜組織中上升的熱休克蛋白 (HSPs) 和氧化壓力 (oxidative stress) (Chi et al., 2014; Tezel et al., 2010)，同樣可以通過神經膠質細胞的 TLR 信號刺激產生內生性免疫反應，增加促發炎因子和免疫刺激性細胞因子的生成 (Tezel et al., 2000)。

腫瘤壞死因子 (TNF- α) 在 1970 年代晚期被發現，其主要為內毒素所誘導產生的血清因子，可以導致某些腫瘤的壞死，故命名之 (Carswell et al., 1975)，其可由淋巴細胞 (lymphoid cells)、肥大細胞 (mast cells)、內皮細胞 (endothelial cells)、纖維母細胞 (fibroblast) 和神經膠質細胞 (glial cells) 所產生 (Wajant et al., 2003)。TNF- α 有兩種不同的接受器，分別為 TNF- α receptor type 1 (TNFR1) 與 TNF- α receptor type 2 (TNFR2)。TNF- α 與 TNFR1 結合後，會啟動 mitogen-activated protein kinase kinase (MEKKs) 途徑，接著活化下游之 p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) 分子。此外，nuclear factor- κ B (NF- κ B) 為 TNF- α 另一個主要活化對象。TNF- α 與 TNFR1 結合之後，可以透過 TNFR1-associated death domain-containing protein (TRADD) 作用接合 TNF receptor-associated factor (TRAF2)，藉由 receptor-interacting protein (RIP) 進一步活化 IKK (inhibitor of nuclear factor- κ B kinase)，並造成 I κ B (inhibitor of nuclear factor- κ B) 磷酸化，釋放出 NF- κ B，並轉位進入細胞核內，結合至特定之序列而啟動相關基因之表現 (Wu & Zhou, 2010)。

近年越多證據顯示 TNF- α 在青光眼之神經退化性過程中，會參與並介導 RGC 細胞的死亡，除了神經膠質所生成的 TNF- α 增加外，同時視網膜神經節細胞 (Retinal ganglion cell, RGC) 和視神經軸突上的 TNF- α 受體 TNF-R1 表現量也會上調 (Yan et al., 2000; Yuan & Neufeld, 2000; Tezel et al., 2001)。並且在以高眼壓模擬青光眼損傷之動物實驗中，也能觀察到相同情形 (Tezel & Wax, 2000; Tezel & Yang, 2004)。RGC 和神經膠質細胞對青光眼損傷的敏感性不同，可以適當地反映出 TNF- α 對不同細胞產生的反應。根據初級細胞的共培養 (primary co-culture) 研究表明，RGC 在暴露於青光眼刺激後會導致由 TNF- α 介導的細胞凋亡，但神經膠質細胞卻可以在相同條件下存活 (Tezel & Wax, 2000)，除此之外，也發現 TNF- α 在斑馬魚中會誘發 Müller cell 中 STAT3 磷酸化的表現，進而影響視網膜再生 (Nelson et al., 2013)。也就是說，視網膜中 TNF- α 與受體 TNF-R1 的結合不只能誘導細胞凋亡的反應，也可以觸發存活的訊息路徑 (Tezel & Yang, 2004)，顯示 TNF- α 的生物活性是通過活化多種訊息途徑之間的串擾 (cross-talk) 來表現 (Shohami et al., 1999; Wajant et al., 2003)。雖然胱天蛋白酶 (caspases) 的活化會促進細胞死亡，但 NF- κ B 依賴性基因的活化則抑制細胞凋亡並促進存活和增殖作用 (Beg & Baltimore, 1996)。這些相反功能途徑之間的平衡決定了 TNF- α 在體內的主要生物活性 (Tezel, 2008)。這也與活體實驗以及臨床的觀察結果一致，即青光眼是一

種針對不同神經元的選擇性疾病，尤其是 RGC 及軸突神經 (axons)，但神經膠質細胞不僅能在青光眼的壓力下生存，而且還能展現出活化的表型 (Tezel et al., 2003)。上述這些研究結果說明了 TNF- α 在參與青光眼病程中的特殊性以及重要性。

Matrix metalloproteinases (MMPs) 為一群結構類似且含鋅 (Zinc) 金屬離子之蛋白水解酶，其能夠催化並分解維持結構之細胞外基質 (ECM)，MMPs 對於組織之結構重組、修補與破壞都扮演著相當重要之角色 (Hijova, 2005)。而 MMPs 除了與細胞基質降解有關，還具有免疫調節之功能，也可以藉由切割細胞激素活化其他酵素。目前人體中至少發現有 25 種 MMPs，根據其構造及受質的不同可至少分為五類：Matrilysins、Collagenases、Stromelysins、Gelatinases 及 Membrane-type MMPs，其中 MMP-9 屬於 gelatinases 類型。MMPs 的調控與許多轉錄因子有關，在 MMP-gene promoter 上有許多訊息傳遞因子的結合位，如：AP-1 (activator proteins-1)、PEA3、SP-1 (specificity protein-1)、NF- κ B 與 p53。三種 MAPKs (Mitogen-activated protein kinases)：ERKs (Extracellular signal regulated kinases)、p38 與 JNK (c-Jun N-terminal kinase) 均參與在 AP-1 的表現及活化過程中 (Vihinen & Kahari, 2002)。在人類的巨噬細胞中，MMP-9 分泌量是最多的，在動物實驗顯示巨噬細胞分泌的 MMP-9 會受到數種細胞激素調節，例如 TNF- α 和 IL-1 β 。而藉由 MMP-9 濃度也可以反映發炎程度，並以此作為評估藥物抗發炎效果的參考依據 (Robert et al., 2016)。

在眼科疾病中，亦有文獻指出 MMP-9 參與眼部發炎相關反應。例如增生性糖尿病視網膜病變 (proliferative diabetic retinopathy, PDR)，由發炎以及缺氧誘導產生的血管內皮生長因子 (VEGF) 和氧化壓力 (oxidative stress) 會共同刺激 pro-MMP-9 的生成與活化，進而導致血管新生 (angiogenesis)、感光細胞喪失 (loss of photoreceptors) 和血視網膜屏障破壞 (blood-retina barrier breakdown) (Opdenakker et al., 2019)。在青光眼方面，根據研究顯示，在青光眼患者的眼球表面以及淚液中都有較高的 MMP-9 濃度 (Zaleska et al., 2019)。且 MMP-9 會參與小梁網 (Trabecular meshwork, TM) 的細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 組織重塑 (remodeling)，導致眼壓 (intraocular pressure, IOP) 的變化，進而影響青光眼的病程 (Page-McCaw et al., 2007)。此外，視網膜神經節細胞層 (ganglion cell layer, GCL) 中 MMP-9 活性的增加，對於誘導 RGC 細胞死亡的過程具有關鍵作用，因為它會促使層粘連蛋白 (laminin) 降解，從而干擾整合素介導 (integrin-mediated) 的生存訊息途徑，導致 RGC 發生脫離誘導凋亡 (detachment-induced apoptosis, 又稱為 anoikis)，意指正常細胞因不能附著於細胞外基質而誘導的細胞凋亡形式 (DeGroef et al., 2014)。綜合上述文獻的探討，顯示 MMP-9 在青光眼的病理機制以及病程的進展有著重要作用。

在視網膜中，已確認有三種重要神經膠質細胞以維持組織微環境的生理平衡，分別是：穆勒細胞 (Müller cell)、星狀膠質細胞 (astrocyte)、小神經膠質細胞 (microglia)。這三種細胞不只提供了結構上的支持，也涉及到組織內物質的代謝，包含神經元碎片 (neuronal debris) 的吞噬作用、傳遞介質和營養因子 (trophic factors) 的釋放以及鉀離子的再吸收 (Vecino et al., 2016)。根據研究顯示，神經膠質細胞 (neuroglia cell) 幾乎對於任何類型的神經元損傷都能做出反應。因此，當視網膜 (retina) 和視神經頭 (optic nerve head) 緊鄰的神經元受損時，星形膠質細胞、穆勒細胞和小膠質細胞的功能和結構會發生相當大的變化。近年有愈來愈多的證據顯示在青光眼損傷期間，視網膜膠質細胞 (retinal glial cell) 在疾病進程具有主導的作用 (Johnson & Morrison, 2009; Prasanna et al., 2011; Silverman et al., 2018)。其中之 (1) 小神經膠質細胞 (Microglia) 的活化涉及許多促發炎因子與發炎蛋白 (iNOS, IL-6, IL-1, TNF- α) 的釋放 (González-Scarano & Baltuch, 1999)。有文獻顯示，在青光眼患者的眼部組織中可以觀察到

與 microglia 活化釋放出的發炎蛋白類似的表現(Bosco et al., 2012)，並且在小鼠青光眼實驗中，施予高眼壓及未施予高眼壓的眼睛中皆觀察到 microglia 的活化(Rojas et al., 2014)，表示有複雜的結構性及擴散性機制牽涉其中，也突顯了 microglia 的活化在青光眼病理機制中的重要性。特別地，在青光眼動物模式中抑制 microglia 的活化可以提升 RGC 的存活率(Bosco et al., 2008; Singhal et al., 2010)，顯示 microglia 可能是青光眼疾病的一個潛在治療目標。(2)視網膜穆勒細胞(Müller cell)為視網膜內之神經膠質細胞的主要成員，約佔了總數的 90%。這種放射狀的細胞會從視網膜的內部玻璃體(vitreous body)邊界延伸至遠端外核層(outer nuclear layer, ONL)的末端。Müller cell 被認為可以執行神經元的許多新陳代謝、離子和細胞外緩衝功能(Turner and Cepko, 1987)。每個 Müller cell 可能只需要滿足其直接相鄰細胞的需求，即可使周圍細胞外環境在面對激烈的神經活動時保持穩定。在視網膜疾病中，活化的 Müller cell 中往往會出現神經膠質纖維酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和麩胺醯胺合成酶(glutamine synthetase, GS)表現量的增加；在青光眼患者的眼睛檢體中，Müller cell 也如預期被檢測出較高表現量的 GFAP (Tezel et al., 2003)。此外，Müller cell 中 ERK 的磷酸化增強也是 Müller cell 在青光眼病理機制中的主要反應之一。另有研究顯示，Glutamate 誘導 Müller cell 中 NF κ B 的活化後，會促進 TNF- α 的表現量上調(Lebrun-Julien et al. 2009)；而升高的 TNF- α 可能會進一步作用於 RGC，透過影響 AMPA receptors 增強 RGC 對興奮性毒性的敏感性(Almasieh et al., 2012)。除了病理性的角色，Müller cell 在某些條件下也會產生保護性的作用。有研究指出，Müller cell 可釋放出 pigment epithelium-derived factor (PEDF)以提升 RGC 細胞在青光眼病程中的存活率 (Eichler et al., 2017)；此外，在斑馬魚的青光眼實驗中，Müller cell 也可透過 STAT 路徑的活化來影響視網膜的再生(Jorstad et al., 2020)。顯然 Müller cell 在視網膜病理機制與視神經保護中都有重要的作用。特別的是視網膜內膠細胞具交互作用(Microglia-Müller cell interaction)，根據文獻指出，在將 Müller cell 與以 LPS 活化的 microglia 的 co-culture 實驗中(Wang et al., 2011b)，Müller cell 表現出高度的反應性，顯示活化的小膠質細胞可以急性地誘導 Müller 細胞產生與適應性及神經保護相關的細胞反應，並且不涉及神經膠病變(gliosis)的表達。在有關青光眼的研究中，視神經軸突切開術(optic nerve axotomy)或視網膜興奮性毒性(excitotoxic injury)損傷會引起 microglia 與 Müller cell 的細胞串擾(cross-talk)的上調，可能有助於調節小神經膠質細胞的活性，產生適應性神經保護作用(adaptive neuroprotection)，使其恢復到正常水平(Wang et al., 2014a)。此外，Müller 細胞還可以形成粘性細胞支架(adhesive cellular scaffold)，引導小神經膠質細胞穿過各個視網膜細胞層，從而對損傷進行反應(Wang et al., 2014b)。

本年度計畫研究使用之真菌成分萃取自桑黃，即裂蹄木層孔菌(*Phellinus linteus* (Berk. & Curt.) Teng)，為著名的東方藥用真菌。一般生長於桑樹 (*Morus alba* L.)的腐爛木材上，在中國、日本和韓國分布尤為豐富(Zhu et al., 2008)。桑黃的子實體(basidiocarps)通常為馬蹄形(horseshoe-shaped)，絨毛表面(pileal surface)新鮮時為深棕色，乾燥時變為黑色；毛孔表面(pore surface)新鮮時為生鏽的棕色，乾燥時變為棕色；乾燥後菌肉(context)為棕色，菌肉上部為黑色甲殼狀，其菌管(tube)為肉桂黃褐色 (Chen et al., 2019)。桑黃含有多種類型化合物，包括多醣類(polysaccharides)、三萜類(triterpenoids)、多酚類(polyphenols)和吡喃類(pyran) (Chen et al., 2019)。根據現代藥理研究，桑黃具有多種生物活性，包括抗發炎(Xie et al., 2019)、免疫調節(Lin et al., 2016)、抗氧化(Kong et al., 2018)、抗微生物和抗病毒(Hwang, et al., 2014)、抗癌(Kojima et al., 2008)、抗糖尿病(Kang et al., 2004)、保肝(Huang et al., 2018)和神經保護(Choi et al., 2016)。針對抗癌活性方面，桑黃成分中屬於 β -葡聚醣聚合物(β -glucan polymers)

的多醣類化合物被認為具有開發成新型抗癌藥物的潛力(Meng et al., 2016)。

桑黃萃取的活性成分 3,4-dihydroxybenzalacetone (DBL)屬於含兒茶酚(catechol, known as pyrocatechol or dihydroxybenzene)結構的苯丙烷類(phenylpropanoid)化合物，由臺中中國醫藥大學藥學院郭悅雄教授提供。根據文獻指出，DBL 除了抗氧化特性(Nakajima et al., 2007; Nakajima et al., 2009)，還具有抗發炎活性、抗腫瘤和神經保護特性(Nakajima et al., 2009)。與其他活性成分相比，DBL 有較佳之抗巴金森活性，能更有效地預防過氧化氫和 6-羥基多巴胺(6-OHDA)誘導的人類神經母細胞瘤細胞株(SH-SY5Y)死亡(Gunjima et al., 2014; Nakajima et al., 2009)。現今有許多研究將天然物用於視網膜相關疾病之研究，例如：番紅花醛(safranal)改善視力的喪失以及視網膜的退化(Fernández et al., 2015; Heitmar et al., 2019)、薑黃素(curcumin)用於治療眼科疾病的效果與潛力(Pescosolido et al., 2014)。常用之中草藥材如枸杞(*Lycium barbarum*)、銀杏(*Ginkgo biloba*)與決明子(*Senna obtusifolia*)也被用於青光眼研究(Manthey et al., 2017; Kang et al., 2018; Lin et al., 2017)，並顯示保護視網膜之功效。故本研究將探討天然物 DBL 的作用機制，以及運用於治療視網膜疾病的潛力。

研究目的

本研究之目的為探討真菌天然物 DBL 在類青光眼病理模式之功效，透過大鼠青光眼動物模式以及視網膜神經膠細胞之誘導發炎模式，我們得以了解藥物是否具有改善大小鼠視網膜功能或結構性損傷並抑制發炎蛋白表現之作用，並可更進一步研究視網膜之小神經膠質細胞(Microglia)與穆氏細胞(Müller cell)在病理模式中的關聯性及交互作用，以及如何影響其他視神經細胞，期許能更清楚這兩者在青光眼病理機制扮演的角色，找到對抗視網膜發炎疾病的治療靶點，對於眼科的預防與治療藥物開發有所貢獻。

運用小鼠視網膜小神經膠細胞(BV-2)與大鼠視網膜穆勒細胞(rMC-1)實驗，因 TLR4 表現量在青光眼病程中會明顯上升，而在眼睛之中富含 TLR4 的小神經膠細胞的活化往往參與在視神經發炎的初期階段，因此本篇研究以 TLR4 的刺激劑脂多醣(LPS)做為 BV-2 的細胞活化誘導劑；而腫瘤壞死因子- α (TNF- α)則是小神經膠細胞活化時主要釋放的促發炎因子之一，同時在青光眼中 TNF- α 在眼中含量也會上升，因此將 TNF- α 做為 rMC-1 之細胞活化之誘導劑，藉此模擬青光眼(glaucoma-like)中視神經發炎之機制，並研究兩種視網膜神經膠之交互作用。透過 MTT、NO、電泳酵素分析法(zymography)、西方墨點法(Western blotting)與流式細胞儀(flow cytometry)等實驗方法探討藥物 DBL 對於視網膜神經膠細胞活化之抑制效果與其作用機制。在動物實驗的部分，則是以大鼠(SD Rat)做為實驗動物，並以輸注液體的方式使其眼內壓(IOP)急促上升，模擬青光眼患者因長期過高的眼內壓進而壓迫視網膜造成的物理性損傷。運用視網膜電位圖(electroretinogram, ERG)、電泳酵素分析法(zymography)與西方墨點法(Western blotting)等實驗方法探討藥物 DBL 對於視網膜功能以及視網膜發炎的保護作用。

三、實驗結果與討論

3.1. 探討 DBL 對於 TNF- α 誘導 rMC-1 細胞釋放 MMP-9 之活性作用及表現程度與 JAK/STAT 抑制劑比較

根據文獻指出，強效發炎介質 TNF- α 在青光眼的視神經退化中扮演調節者的角色，而 TNF- α 在眼睛中的主要來源即是神經膠細胞，特別是對局部發炎反應有主導作用的小神經膠細胞(Bosco et al., 2012)。因此利用 TNF- α 作用於視網膜穆氏細胞(Müller cell)之細胞株

rMC-1，誘導細胞活化並釋出發炎相關因子 MMP-9，藉由酵素電泳法分析 MMP-9 分解明膠的活性強弱，評估藥物對於抑制細胞發炎反應的能力。根據實驗結果顯示 (Figure 1A)，加入不同濃度之 DBL (2, 5, 10 μ M) 30 分鐘，並以 TNF- α (50 ng/mL) 刺激 rMC-1 細胞 24 小時後，各組別培養液中 MMP-9 的活性倍率相較於未刺激組分別為 Vehicle: 2.50 ± 0.21 倍、DBL 2 μ M: 2.01 ± 0.26 倍、DBL 5 μ M: 1.73 ± 0.23 倍、DBL 10 μ M: 1.36 ± 0.24 倍 (n = 3)，依 DBL 濃度梯度呈現顯著的抑制 MMP-9 活性作用，顯示藥物 DBL 具有抑制 rMC-1 細胞活化或降低發炎相關因子表現與釋放的作用。

以 Western Blotting 探討在 rMC-1 細胞中，DBL 不同濃度影響 TNF- α (50 ng/mL) 誘導細胞 MMP-9 蛋白質表現量之情形，結果顯示 MMP-9 蛋白表現量明顯受到藥物抑制，其趨勢與藥物 DBL 呈濃度梯度關係。根據實驗統計，當 rMC-1 細胞在 TNF- α (50 ng/mL) 刺激下，細胞內 MMP-9 蛋白表現量為未刺激組的 1.56 ± 0.07 倍 (n = 3)，而在不同濃度 DBL (2, 5, 10 μ M) 作用下，相較於未刺激組，各組影響 TNF- α 誘導 rMC-1 細胞之 MMP-9 蛋白表現量倍率分別為：DBL 2 μ M: 1.04 ± 0.15 倍、DBL 5 μ M: 0.92 ± 0.09 倍、DBL 10 μ M: 0.82 ± 0.09 倍 (n = 3) (Fig. 1B)。此處結果與前述酵素電泳法實驗結果所測定 rMC-1 細胞釋放之 MMP-9 活性抑制作用呈現一致的趨勢。

在前述實驗結果利用 Western blotting 實驗方法，確認藥物 DBL 對於 TNF- α 刺激之 rMC-1 細胞，此處以 Zymography 實驗方法，利用 STAT3 的上游調控因子 JAK 之小分子抑制藥物 AG490，釐清它對於 TNF- α 誘導 rMC-1 細胞釋放之 MMP-9 活性的作用與比較，以確認能否經由影響 STAT3 磷酸化進而調控 MMP-9 生成。根據實驗結果 (Fig. 1C)，加入不同濃度之藥物 (AG490 10, 20 μ M; DBL 10 μ M) 至 rMC-1 細胞 30 分鐘，並以 TNF- α (50 ng/mL) 刺激 24 小時後，各組別之 MMP-9 的活性倍率相較於未刺激組分別為 Vehicle: 2.82 ± 0.32 倍、AG490 10 μ M: 2.20 ± 0.19 倍、AG490 20 μ M: 1.75 ± 0.19 倍、DBL 10 μ M: 1.54 ± 0.26 倍 (n = 4)。根據上述結果顯示，JAK 抑制劑 AG490 雖然有抑制 MMP-9 活性的作用，但 AG490 惟有在高濃度 (20 μ M) 時才有著接近 DBL 10 μ M 抑制 MMP-9 活性的效果。由此可知，DBL 雖然可以透過抑制 STAT3 磷酸化降低 MMP-9 生成，但可能會同時調控其他訊息因子 (p65 or ERK) 進而影響 MMP-9 表現。

由於細胞死亡會影響蛋白之表現量或 MMP-9 釋放減少，本實驗欲探討天然物 DBL 是否會直接造成大鼠視網膜穆細胞 rMC-1 或小鼠小神經膠細胞 BV-2 損傷，於此處使用 MTT assay 測定細胞之粒線體功能，以分析細胞存活之情形 (Supplementary Fig. 1)。在 rMC-1 細胞之實驗中，藥物作用之下，其細胞存活情形與未刺激組相比則為 0.89 ± 0.02 倍 (10 μ M DBL, n = 3) (Supplementary Fig. 1A)；而在 BV-2 細胞之實驗中，在藥物 DBL 的作用下，其細胞存活情形與未刺激組相比為 0.87 ± 0.03 倍 (10 μ M DBL, n = 3) (Supplementary Fig. 1B)。由結果得知藥物 DBL 在 10 μ M 之下，兩種細胞中存活率仍接近 90%，因此在後續細胞實驗中以 10 μ M 為最大給藥濃度。

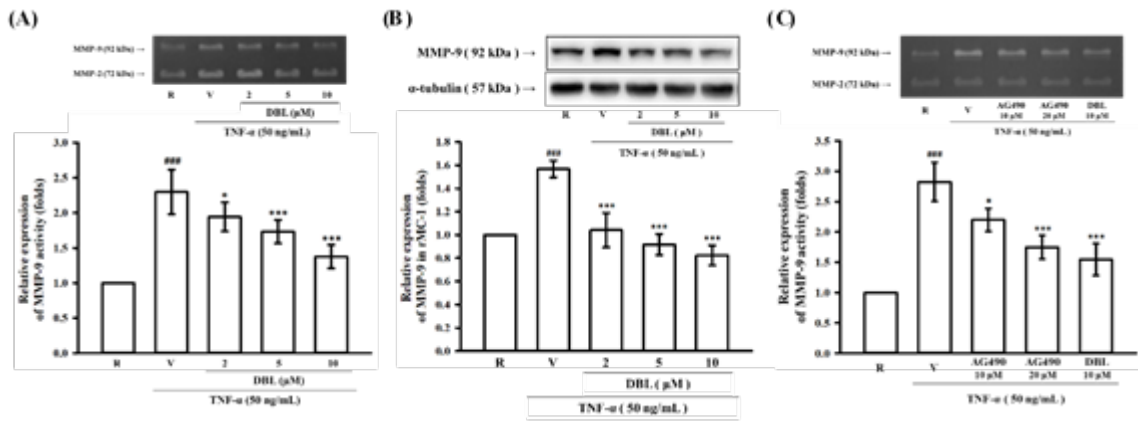


Figure 1. Effects of DBL on TNF α -induced MMP-9 activation, expression and comparison with specific inhibitor in rMC-1. The rMC-1 cells (1×10^6 cells/mL) were dispensed into 12-well plate and treated with DBL (2 μ M, 5 μ M and 10 μ M) for 30 mins and then treated with TNF α (50 ng/mL) for 24 hrs. On the other hand, rMC-1 cells were also dispensed into 12-well plate and treated with AG490 (10 μ M and 20 μ M) or DBL (10 μ M) for 30 mins and then treated with TNF α (50 ng/mL) for 24hrs. (A) MMP-9 activation and (B, C) protein expression were detected by zymography and WB, respectively. Data represents means \pm S.D. of 3-4 independent experiments. #### $P < 0.001$ compared to resting. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to vehicle.

3.2. 探討DBL在TNF- α 刺激視網膜rMC-1細胞內調控之訊息路徑

在前述實驗結果利用Zymography及Western blotting實驗方法，確認藥物DBL對於TNF- α 誘導rMC-1生成及釋放MMP-9之活性皆有抑制作用後，此處運用Western blotting進一步確認DBL在視網膜rMC-1細胞內調控之訊息因子，以確認其作用路徑，並與作用於BV-2之路徑相互對照與比較。首先利用Western Blotting觀察JAK / STAT家族中轉錄因子STAT3蛋白的表現情形，以了解藥物DBL對於TNF- α 誘導rMC-1細胞中STAT3磷酸化之影響。在給予rMC-1細胞不同濃度之藥物DBL (2, 5, 10 μ M) 30分鐘後，加入TNF- α (50 ng/mL) 刺激1小時，接著進行蛋白質定量並以西方點墨法分析。根據實驗結果顯示(Figure 2A)，相較於未刺激組，其餘各組細胞內STAT3磷酸化蛋白表現量倍率分別為Vehicle：1.99 \pm 0.30倍、DBL 2 μ M：1.77 \pm 0.08倍、DBL 5 μ M：1.46 \pm 0.22倍、DBL 10 μ M：1.12 \pm 0.39倍 (n = 4)，在各個給藥濃度都達到統計上顯著意義($P < 0.05$, $P < 0.01$)。顯示針對STAT3蛋白的磷酸化，DBL具有濃度梯度的抑制作用，與MMP-9活性與表現量測定的結果呈現近似的趨勢。接著探討STAT3磷酸化之抑制蛋白SOCS3的表現情形，以了解藥物DBL是否藉由上調SOCS3間接抑制p-STAT3之表現量。給予rMC-1細胞不同濃度之藥物DBL (2, 5, 10 μ M) 30分鐘後，加入TNF- α (50 ng/mL) 刺激1小時，接著進行蛋白質定量並以西方點墨法分析。根據實驗結果顯示(Fig. 2B)，相較於未刺激組，其餘各組細胞內STAT3磷酸化蛋白表現量倍率分別為Vehicle：0.96 \pm 0.09倍、DBL 2 μ M：1.02 \pm 0.14倍、DBL 5 μ M：1.01 \pm 1.15倍、DBL 10 μ M：0.97 \pm 0.14倍 (n = 3)，顯見不論是TNF- α 還是DBL都不會對rMC-1細胞之SOCS3產生影響，也由此佐證DBL並非經由SOCS3進而抑制STAT3之磷酸化。

利用Western Blotting觀察MAPK家族中ERK 1/2蛋白的表現情形，以了解藥物DBL對於TNF- α 誘導rMC-1細胞中ERK 1/2磷酸化之影響。在給予rMC-1細胞不同濃度之藥物DBL (2,

5, 10 μM) 30分鐘後，加入TNF- α (50 ng/mL) 刺激15分鐘，接著進行蛋白質定量並以西方點墨法分析。根據實驗結果顯示(Supplementary Fig. 2A)，相較於未刺激組，其餘各組細胞內ERK 1/2磷酸化蛋白表現量倍率分別為Vehicle: 2.10 ± 0.46 倍、DBL 2 μM : 1.28 ± 0.43 倍、DBL 5 μM : 1.10 ± 0.36 倍、DBL 10 μM : 1.02 ± 0.36 倍 ($n=4$)，且在各個給藥濃度都達到統計上顯著意義。顯示針對ERK 1/2蛋白的磷酸化，DBL具有濃度梯度的抑制作用，與MMP-9活性與表現量測定的結果呈現近似的趨勢。隨後觀察NF- κB 家族的轉錄因子p65蛋白的表現情形，以了解藥物DBL對於TNF- α 誘導rMC-1細胞中p65磷酸化之影響。在給予rMC-1細胞不同濃度之藥物DBL (2, 5, 10 μM) 30分鐘後，加入TNF- α (50 ng/mL) 刺激1小時，接著進行蛋白質定量並以西方點墨法分析。根據實驗結果顯示(Supplementary Fig. 2B)，相較於未刺激組，其餘各組細胞內p65磷酸化蛋白表現量倍率分別為Vehicle: 1.85 ± 0.45 倍、DBL 2 μM : 1.68 ± 0.51 倍、DBL 5 μM : 1.23 ± 0.16 倍、DBL 10 μM : 1.10 ± 0.20 倍 ($n=4$)，並在較高給藥濃度(5, 10 μM) 達到統計上顯著意義($P < 0.05$)。顯示針對TNF- α 誘導rMC-1細胞中p65的磷酸化，DBL具有抑制作用，且具有明顯濃度梯度效應。綜合上述DBL針對TNF- α 誘導rMC-1細胞活化之訊息調控探討，p65、STAT3以及ERK 1/2蛋白的磷酸化表現量會受到藥物DBL抑制，顯示DBL可能在TNF- α 誘導rMC-1細胞活化中，對於NF- κB 、JAK/STAT以及MAPK pathway都有不同程度的參與，透過抑制這些發炎相關路徑降低rMC-1活化，進而降低發炎相關因子 (如MMP-9) 表現與釋放。

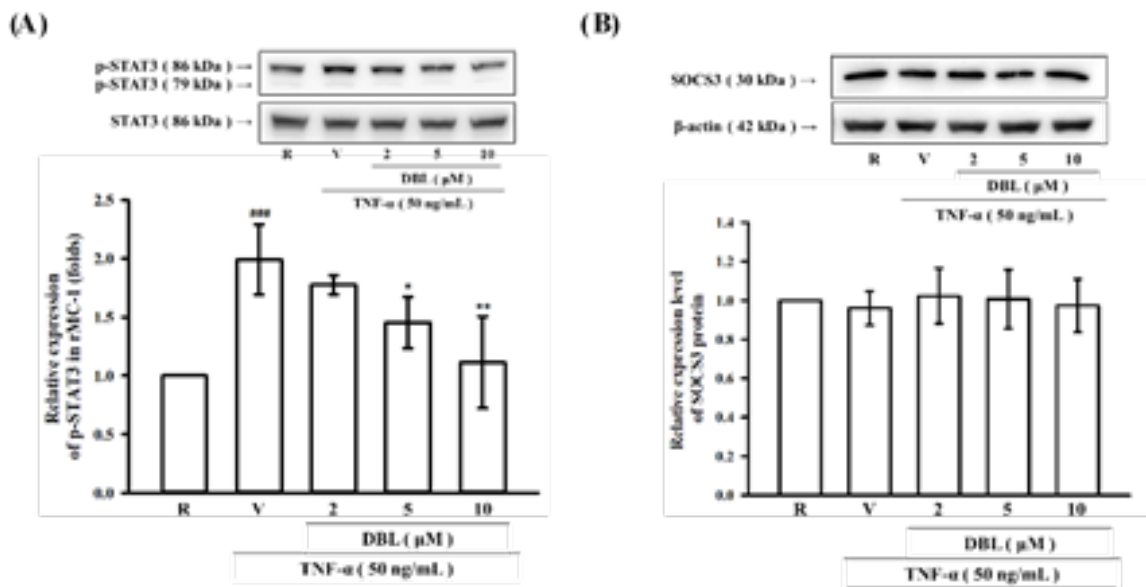


Figure 2. Effects of DBL on TNF α -induced Phosphorylation of STAT3 and SOCS3 expression in rMC-1 cells. rMC-1 cells (1×10^6 cells/mL) were dispensed into 6-well plate and treated with DBL (2 μM , 5 μM and 10 μM) for 30 mins and then treated with TNF α (50 ng/mL) for 1 hr. (A) pSTAT3 and (B) SOCS3 were detected by WB. Data represents means \pm SD from 4 independent experiments. ### $P < 0.001$ compared to resting. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to vehicle.

3.3. 探討 DBL 對於 BV-2 Conditioned Medium 誘導 rMC-1 細胞釋放 MMP-9 之活性作用

及對 LPS 活化小神經膠細胞之作用

探討視神經發炎中視網膜神經膠細胞的交互作用與關連性，本研究利用 LPS (150 ng/mL) 刺激 BV-2 細胞 24 小時後，收集其細胞上清液，與新鮮之細胞培養液 (0.5% DEME) 等體積混合後，即為 BV-2 之 conditioned medium。接著加入不同濃度之 DBL (2, 5, 10 μ M) 至 rMC-1 細胞 30 分鐘，並以 BV-2 之 conditioned medium 刺激 rMC-1 細胞 24 小時後，檢測其釋放至培養液中 MMP-9 活性。根據實驗結果顯示 (Figure 3A)，未經 LPS 刺激的 BV-2 conditioned medium 組與有使用 LPS 刺激的 BV-2 conditioned medium 組，上述兩組相較於未刺激組 (即未使用包含 BV-2 conditioned medium 在內的任何刺激之組別)，其 MMP-9 的活性倍率分別為 BV-2 CM: 2.37 ± 0.49 倍、LPS-treated BV-2 CM: 2.87 ± 0.38 倍 ($n=3$)，兩組之 MMP-9 活性皆呈現顯著上升，說明在未經 LPS 處理下，BV-2 細胞之正常代謝物可能也會誘發 rMC-1 細胞之活化。而在給藥組的部分，與未刺激組比較，其 MMP-9 活性倍率分別為 DBL 2 μ M: 2.15 ± 0.13 倍、DBL 5 μ M: 1.98 ± 0.19 倍、DBL 10 μ M: 1.41 ± 0.14 倍 ($n=3$)，相較於刺激組別，MMP-9 活性在給予 DBL 的組別呈現濃度梯度式的減低，顯示 DBL 可能降低小神經膠細胞過度活化對於視網膜 Müller 細胞之影響。

根據文獻顯示，小神經膠細胞(microglia)的異常活化在視網膜疾病的病理中扮演重要角色(Bosco et al., 2012)。以 TLR4 活化劑 LPS 刺激 BV-2 後，會誘發 BV-2 細胞活化產生發炎反應，藉由特定酵素表現，導致細胞中自由基 ROS 和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的生成與釋放，因此 NO 與 ROS 被視為發炎指標物質之一。本實驗測定 NO 的釋出濃度，評估 DBL 對於細胞發炎反應是否具有抑制作用。由實驗結果顯示 (Figure 3B)，加入不同濃度之 DBL (2, 5 and 10 μ M) 30 分鐘並以 LPS (150 ng/mL) 刺激 BV-2 細胞 24 小時後，各組培養液中 NO 含量分別為 Resting: 3.05 ± 1.03 μ M、Vehicle: 22.35 ± 3.63 μ M、DBL 2 μ M: 17.29 ± 5.13 μ M、DBL 5 μ M: 12.57 ± 4.15 μ M、DBL 10 μ M: 7.12 ± 1.87 μ M ($n=3$)。由本實驗結果得知，NO 的釋放隨著給藥濃度升高而降低，呈濃度梯度抑制作用，並在 DBL (5 μ M 與 10 μ M) 達統計上顯著意義 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$)。另一方面，運用 flow cytometry 測量 ROS 生成。由實驗結果得知，ROS 的生成隨著 DBL 給藥濃度(2, 5 and 10 μ M) 升高而降低，即呈現濃度梯度抑制作用，並在三種 DBL 濃度達統計上顯著意義 ($P < 0.001$, Figure 3C)。

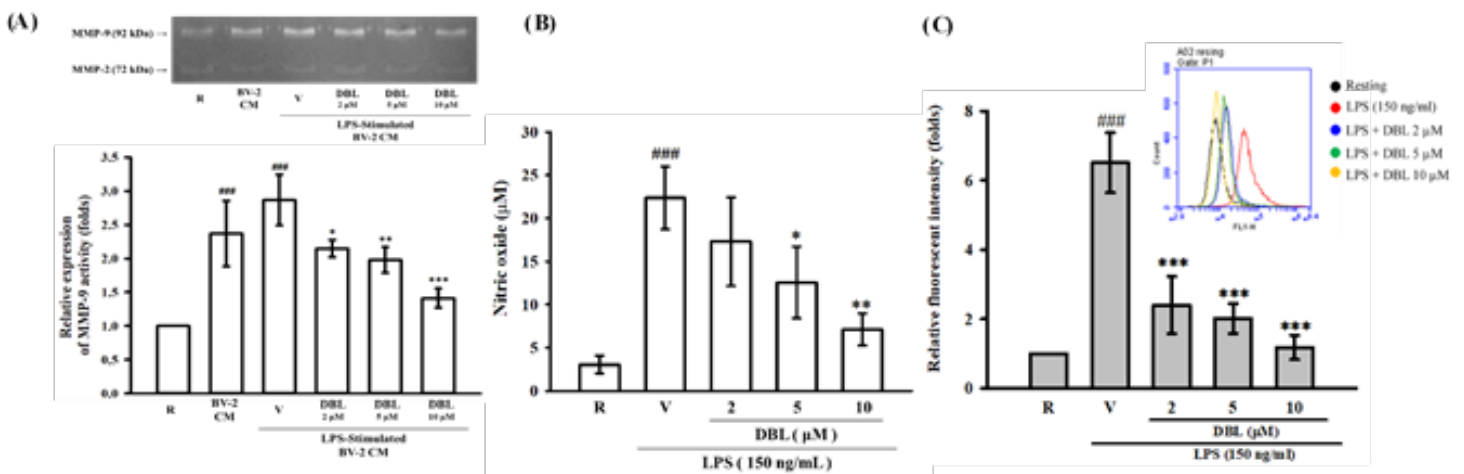


Figure 3. Effects DBL on LPS-stimulated BV-2 conditioned medium-induced MMP-9

activation in Muller cells, LPS-induced nitric oxide and ROS in microglial BV-2. (A) BV-2 cells (3×10^5 cells/ml) were treated with LPS (150 ng/ml) for 24 hours. The supernatant of 150 ng/ml LPS-treated BV-2 cells was used as conditioned medium (CM). Muller cells were co-cultured with CM 24 hours. Muller cells co-cultured with BV-2 CM pretreated with DBL (2, 5 and 10 μ M) 30 minutes before LPS stimulation ($^{###}p < 0.001$ as compared with the resting, $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ as compared with the vehicle, $n=3$). BV-2 cells were pretreated with DBL or vehicle for 15 minutes before treatment with LPS (150 ng/ml) for 24 hours. (B) The NO content of isolated medium was detected. (C) The intracellular ROS were detected by flow cytometry. Data represents means \pm SD ($^{###}p < 0.001$ as compared with the resting, $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ as compared with the LPS, $n=3$).

3.4. 探討 DBL 對於 LPS 誘導 BV2 細胞產生 iNOS 與 COX-2 蛋白質表現量及訊息路徑之影響

由於 LPS 能夠透過 TLR4/MyD88/NF- κ B 之路徑，造成誘導型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 與環氧化酶 (cyclooxygenase-2, COX-2) 的蛋白表現量上升，誘發發炎反應，故此處以西方點墨法，評估藥物 DBL 對於 BV-2 細胞內 iNOS 與 COX-2 表現量之影響。根據結果顯示 (Figure 4A)，加入不同濃度之 DBL (2, 5, 10 μ M) 30 分鐘，並以 LPS (150 ng/mL) 刺激 BV-2 細胞 24 小時後，與未刺激組相比，各組對於 iNOS 表現量的倍率分別為 Vehicle: 11.41 ± 2.26 倍、DBL 2 μ M: 8.37 ± 2.66 倍、DBL 5 μ M: 5.65 ± 2.77 倍、DBL 10 μ M: 3.23 ± 1.53 倍 ($n=3$)，呈現顯著的濃度梯度抑制作用，並在 DBL 濃度 5 與 10 μ M 達統計上顯著意義 (Figure 4B)。而在 COX-2 表現量的部分，各組相較於未刺激組之倍率分別為 Vehicle: 10.72 ± 2.27 倍、DBL 2 μ M: 10.80 ± 1.01 倍、DBL 5 μ M: 9.87 ± 1.41 倍、DBL 10 μ M: 6.75 ± 1.16 倍 ($n=3$)，顯示較低濃度的 DBL (5, 10 μ M) 對於 COX-2 蛋白質表現量無抑制效果，只有在較高濃度 (10 μ M) 有明顯抑制作用並達到統計上顯著意義 (Figure 4C)。由上述結果顯示，藥物 DBL 對於 iNOS 以及 COX-2 有著不同程度的影響。

在前述利用 NO assay 以及 Western blotting 實驗結果，確認藥物 DBL 對於 LPS 誘導 BV-2 生成 NO 以及 iNOS 的蛋白表現量有抑制作用後，隨後運用 Western blotting 進一步確認 DBL 在 BV-2 細胞內調控之訊息因子，以確認其作用路徑。首先運用 Western blotting 觀察觀察 JAK/STAT 家族中轉錄因子 STAT3 蛋白的表現情形，以了解藥物 DBL 對於 LPS 誘導 BV-2 細胞中 STAT3 磷酸化之影響。在給予 BV-2 細胞不同濃度之藥物 DBL (2, 5, 10 μ M) 30 分鐘後，加入 LPS (150 ng/mL) 刺激 3 小時，接著進行蛋白質定量並以西方點墨法分析。根據實驗結果顯示 (Figure 4D)，相較於未刺激組，其餘各組細胞內 STAT3 磷酸化蛋白表現量倍率分別為 Vehicle: 5.16 ± 0.55 倍、DBL 2 μ M: 4.21 ± 0.70 倍、DBL 5 μ M: 3.24 ± 0.51 倍、DBL 10 μ M: 2.86 ± 0.42 倍 ($n=3$)，在各個給藥濃度都達到統計上顯著意義 (Figure 4E)。顯示針對 STAT3 蛋白的磷酸化，DBL 具有濃度梯度的抑制作用，與 NO 含量測定的濃度梯度結果呈現近似的趨勢。

更進一步觀察 MAPK 家族中 ERK 1/2 蛋白的表現情形，以了解藥物 DBL 對於 LPS 誘導 BV-2 細胞中 ERK 1/2 磷酸化之影響。在給予 BV-2 細胞不同濃度之藥物 DBL (2, 5, 10 μ M) 30 分鐘後，加入 LPS (150 ng/mL) 刺激 30 分鐘，接著進行蛋白質定量並以西方點墨法分析。根據實驗結果顯示 (Supplementary Fig. 3A)，相較於未刺激組，其餘各組細胞內 ERK 1/2 磷酸化蛋白表現量倍率分別為 Vehicle: 7.35 ± 0.11 倍、DBL 2 μ M: 9.66 ± 0.95 倍、DBL 5

μM : 12.26 ± 0.19 倍、DBL $10 \mu\text{M}$: 10.50 ± 2.27 倍。顯示針對 ERK 1/2 的磷酸化，根據統計結果，雖然 LPS 具有意義地活化 ERK 磷酸化，但 DBL 並沒有明顯抑制作用。

隨後探討 NF- κB 家族的轉錄因子 p65 蛋白的表現情形，以了解藥物 DBL 對於 LPS 誘導 BV-2 細胞中 p65 磷酸化之影響。在給予 BV-2 細胞不同濃度之藥物 DBL (2, 5, 10 μM) 30 分鐘後，加入 LPS (150 ng/mL) 刺激 30 分鐘，接著進行蛋白質定量並以西方點墨法分析。根據實驗結果顯示(Supplementary Fig. 3B)，相較於未刺激組，其餘各組細胞內 p65 磷酸化蛋白表現量倍率分別為 Vehicle: 5.76 ± 0.61 倍、DBL 2 μM : 5.45 ± 0.65 倍、DBL 5 μM : 5.17 ± 0.90 倍、DBL 10 μM : 3.49 ± 0.61 倍 ($n = 3$)，並只有最高給藥濃度 (10 μM) 達到統計上顯著意義。顯示針對 p65 的磷酸化，DBL 只有在較高濃度具有明顯的抑制作用，與 NO 含量測定的濃度梯度結果未呈現相似趨勢。

綜合上述 DBL 針對 LPS 誘導 BV-2 細胞活化之訊息調控探討，STAT3 與 p65 的磷酸化蛋白的表現量受到藥物 DBL 抑制，其中又以 STAT3 磷酸化之抑制作用較為明顯，而對於 ERK 磷酸化則沒有抑制效果。上述結果指出 DBL 可能在 LPS 誘導 BV-2 細胞活化中，主要對於 JAK/STAT pathway 中有重要程度的參與，透過抑制這發炎相關訊息路徑降低 BV-2 活化，進而降低促發炎因子的釋放。

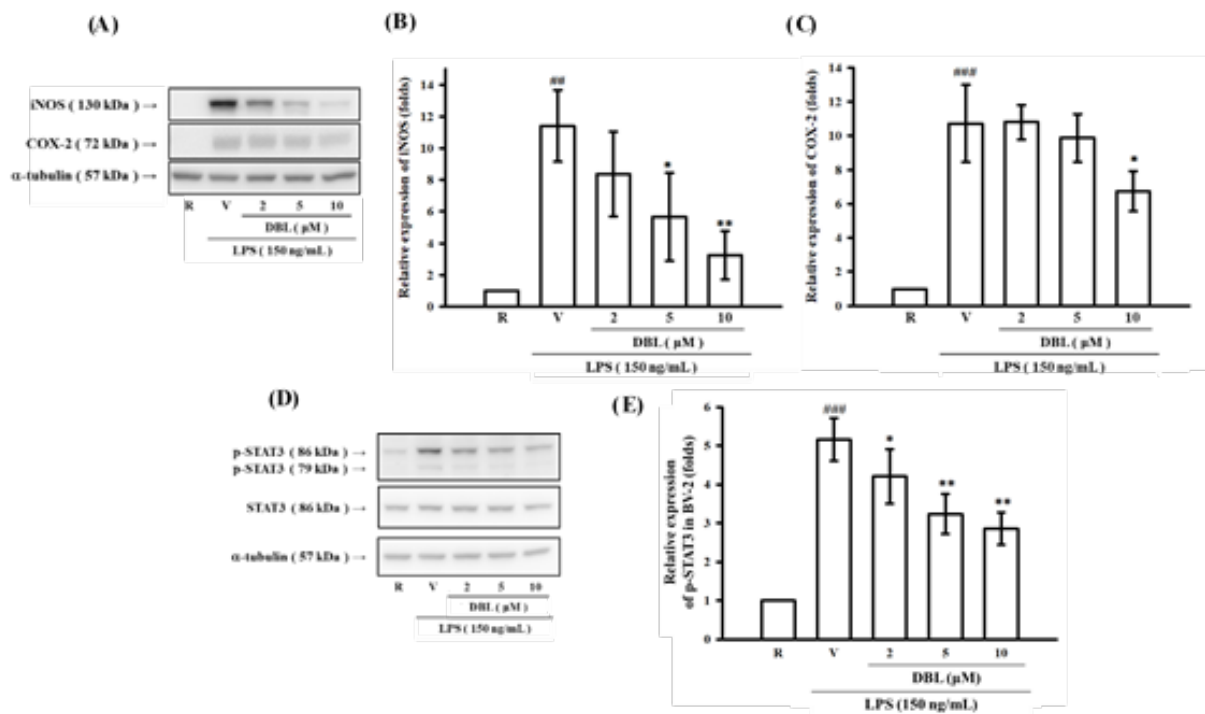


Figure 4. Effects DBL on LPS-induced inflammatory proteins expression and STAT activation in microglial BV-2. BV-2 cells were pretreated with DBL (2, 5, 10 μM) or vehicle for 30 minutes before treatment with LPS (150 ng/ml) for 24 h. For the signal study, the activation time was stimulated by LPS for 3 h. The cell lysates were obtained and analyzed for (A, B) iNOS, (A, C) COX-2 and (D, E) phosphorylated STAT3 proteins by Western blots. Data represent means \pm SD. from three independent experiments (^{##} $p < 0.01$, ^{###} $p < 0.001$ as compared with the resting. ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ as compared with the vehicle under LPS, $n = 3$).

3.5. 探討 DBL 在高眼壓誘導視網膜損傷下對視網膜電生理與對視網膜 MMP-9 表現及前房液 MMP-9 活性之影響

在青光眼疾病中，視網膜組織會因眼內壓的壓迫而受到損傷，進而影響視網膜電生理功能。此處以大鼠眼睛前房液體輸注的方式模擬高眼壓造成之傷害，在給予高眼壓傷害 (Glaucoma-like I/R-injury) 並以腹腔注射藥物 DBL (30 mg/kg) 兩天後，暗適應 (dark adaptation) 處置大鼠一晚，接著以視網膜電圖 (Electroretinogram, ERG) 儀器測量右側眼的視網膜電生理，評估藥物 DBL 在高眼壓損傷下對於視網膜的功能是否具有保護作用。(一) Scotopic ERG 主要反映的是感光細胞中桿細胞 (Rod cell) 的功能，可依其波形分為 a-wave 與 b-wave (Figure 5A)，再將 a-wave 與 b-wave 分開統計加以比較。根據統計，各組大鼠右眼之 a-wave 伏特數值分別為 Sham: 221.61 ± 19.48 倍、Vehicle: 126.32 ± 24.31 倍、DBL (30 mg/kg): 222.06 ± 22.10 倍；而 b-wave 則為 Sham: 569.76 ± 69.76 倍、Vehicle: 84.14 ± 49.11 倍、DBL (30 mg/kg): 272.93 ± 43.91 倍。實驗結果顯示，傷害組相較於假手術組，其 a-wave 與 b-wave 皆明顯降低，而給藥組相較於傷害組，能明顯回復 a-wave 與 b-wave，且兩者皆在統計上達顯著意義 ($P < 0.001$)。(二) 以 STR 模式測量視網膜的電生理波，STR ERG 主要反映的是視網膜神經節細胞 (Retinal ganglion cells, RGC) 的功能，可依其波形分為 positive STR (p-STR) 與 negative STR (n-STR) (Supplementary Fig. A and B)，再將 p-STR 與 n-STR 分開統計加以比較。將大鼠麻醉後，給予定時定量之光刺激，以 ERG 系統紀錄其電生理波。根據統計，各組大鼠右眼之 p-STR 伏特數值分別為 Sham: 445.28 ± 39.28 μV 、Vehicle: 189.20 ± 17.63 μV 、DBL (30 mg/kg): 211.20 ± 13.31 μV ；而 n-STR 則為 Sham: 185.39 ± 44.97 μV 、Vehicle: 114.10 ± 28.88 μV 、DBL (30 mg/kg): 132.40 ± 26.45 μV 。實驗結果顯示，傷害組相較於假手術組，其 p-STR 與 n-STR 皆明顯降低，而給藥組相較於傷害組，並無回復 p-STR 或 n-STR 作用。

根據文獻指出，MMP-9 對於眼部發炎機制為一重要指標 (Opdenakker et al., 2019)，且在青光眼患者的淚液中有明顯較高表現量 (Zaleska et al., 2019)。本實驗藉由測定眼前房液中 MMP-9 活性與視網膜內 MMP-9 含量，評估藥物 DBL 是否能減緩高眼壓造成視網膜損傷之依據。**視網膜中 MMP-9 蛋白表現量** 在給予高眼壓傷害 (Glaucoma-like I/R-injury) 並以腹腔注射藥物 DBL (30 mg/kg) 兩天後，將大鼠以麻醉方式犧牲，摘取眼球並做均質化處理，取得視網膜之組織均質液。未做處置的對側眼為 contralateral eye；以高眼壓傷害的右側眼為 ipsilateral eye。運用 Western blotting 分析視網膜內 MMP-9 的表現量，以評估藥物 DBL 對於抑制眼部發炎反應的能力。根據統計 (Figure 5B)，各組大鼠的 contralateral eye 之 MMP-9 表現倍率相較於 Sham 組分別為 Vehicle: 1.18 ± 0.53 倍、DBL (30 mg/kg): 1.08 ± 0.56 倍；而 ipsilateral eye 則為 Vehicle: 6.65 ± 2.06 倍、DBL (30 mg/kg): 1.51 ± 0.73 倍。實驗結果顯示，傷害組的右眼 (ipsilateral eye) 相較於假手術組，其 MMP-9 表現量明顯上升，且在給予藥物 DBL 的組別，能顯著降低 MMP-9 表現量 ($P < 0.001$)。綜合上述實驗，顯示 DBL 具有降低高眼壓誘導之眼部發炎反應的能力。**前房液中 MMP-9 活性分析** 運用酵素電泳法 (Zymography) 分析前房液 (aqueous humor) MMP-9 分解明膠的活性強弱，以評估藥物 DBL 對於抑制眼部發炎反應的能力。根據統計 (Figure 5C)，各組大鼠的 contralateral eye 之 MMP-9 活性倍率相較於 Sham 組分別為 Vehicle: 1.07 ± 0.32 倍、DBL (30 mg/kg): 0.82 ± 0.18 倍；而 ipsilateral eye 則為 Vehicle: 11.00 ± 2.52 倍、DBL (30 mg/kg): 3.57 ± 0.45 倍。實驗結果

顯示，傷害組的右眼(ipsilateral eye)相較於假手術組，其 MMP-9 活性明顯上升，且在給予藥物 DBL 的組別，能顯著降低 MMP-9 活性($P < 0.001$)。

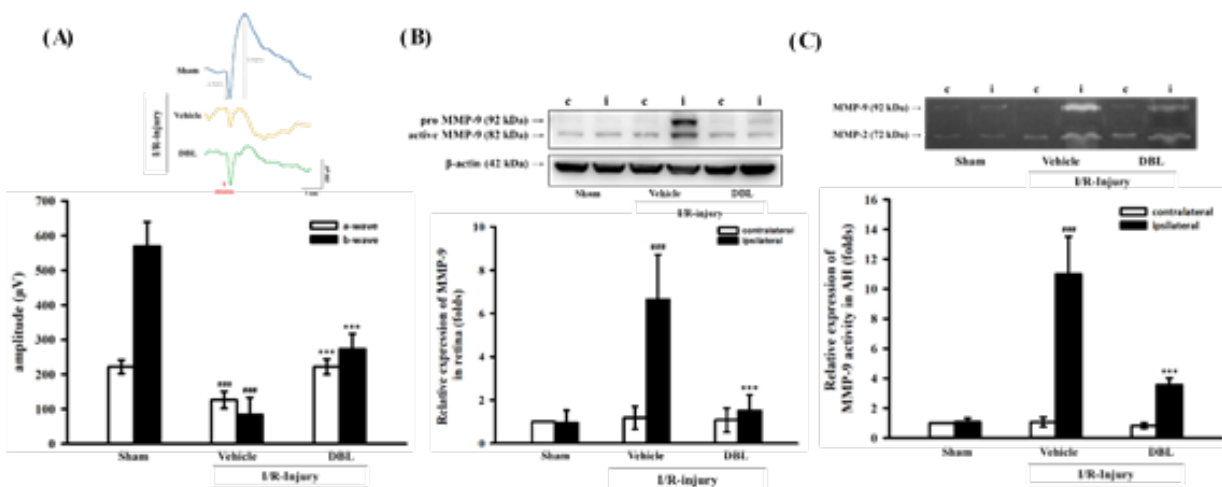


Fig. 5. DBL protected the retinal function of the the combined rod–cone response, scotopic threshold response (STR) and the humoral activation and retinal expression of MMP-9 after high IOP-induced I/R-injury.

(A) Representative combined rod–cone response responses from a control rat (blue curve) and an I/R-injured rat treated with the vehicle (red curve), or DBL (30 mg/kg) (green curve) were recorded 48 h after I/R-injury. The amplitudes of the a- and b-wave were averaged and quantified. The results were presented as the mean±SD from 4 animals. I/R: ischemia-reperfusion. ### $p < 0.001$ compared with the sham control group; ** $p < 0.01$ compared with I/R-injured group treated with vehicle. (B) The protein level of MMP-9 in retina homogenates was evaluated by western blot 48 h after IOP-induced I/R injury. α -tubulin was used as internal control. (C) MMP-9 gelatinolytic activity in rat anterior segment (aqueous humor) of the eye was evaluated by zymography. The posterior segment (retina homogenate) or anterior segment (aqueous humor) from control and I/R-injured rat in the presence or absence of DBL (30 mg/kg) was determined. Representative bands were shown by western blot and zymography and each group could be classified by ipsilateral eye (high IOP-operated eye, the black bar) and contralateral side (non-operated eye, the white bar). The quantification values were presented as the mean±SD of the results from 4 animals. AH: aqueous humor; i: ipsilateral; c: contralateral; I/R: ischemiareperfusion; ### $p < 0.001$ compared with the sham control group; *** $p < 0.001$ compared with I/ R-injured group treated with vehicle.

3.6. 運用視網膜瞳孔光反應(PLR)評估真菌衍生物DBL的保護作用可改善藍光所導致小鼠視網膜功能的損傷

首先評估真菌衍生物DBL對藍光損傷視網膜的保護作用，以PLR反應評估之。在小鼠右眼

藍光處理後，可發現PLR作用明顯降低至1/3正常值(Figure A and B)。當以 DBL (30 mg/kg) 腹腔注射給藥處理後，這PLR參數可明顯逆轉提升為約兩倍(Figure 6B)。統整上述PLR實驗結果顯示，DBL明顯具有改善藍光損傷的功能療效。

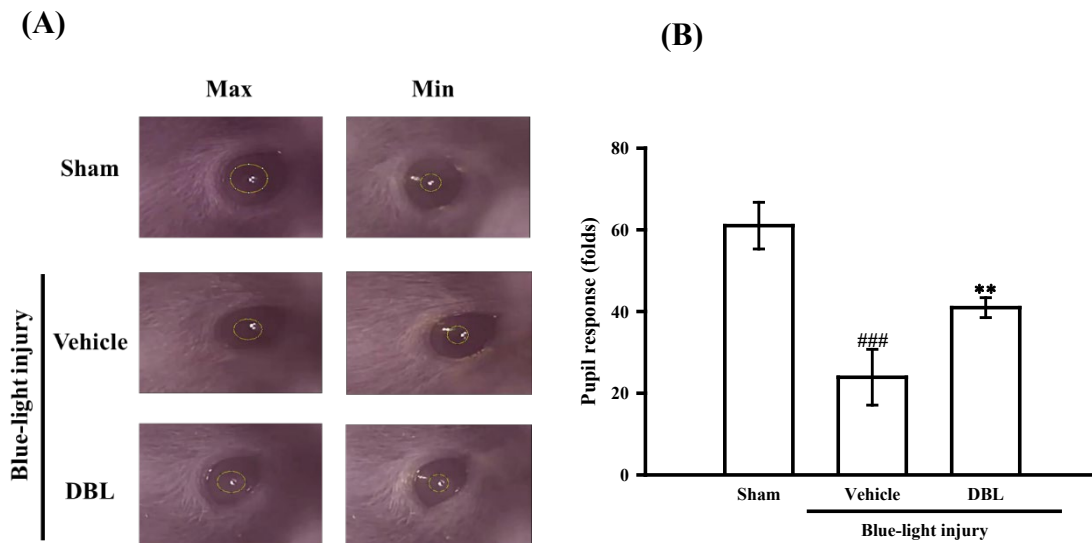


Figure 6. Effects of DBL on blue light-induced pupil response in mice. PLR was manipulated to evaluate changes in pupil response in control mice or pretreated with DBL (30 mg/kg), then triggered irradiation of blue light (800 lux) for 0.5 h. After 6 h, the PLR was evaluated (A and B). The results were expressed as the mean±SD. ^{###} $p<0.001$ and ^{**} $p<0.01$ as compared with the resting (n=4).

3.7. 運用視網膜電生理(ERG)評估真菌衍生物DBL的保護作用可改善藍光所導致小鼠視網膜功能的損傷

針對藍光所導致小鼠視網膜 rod 與 cone 的損傷評估，運用 ERG 之 a 與 b 波變化加以評估視網膜細胞之功能。高眼壓處理下，ERG之 a 與 b 波很明顯地降低，此與正常對照組比較 (Figure 7A and B)。特別地，上述 ERG 損傷變化程度僅在DBL (30 mg/kg) 處理後，a波與b波的變化在經 DBL處理後，均有明顯改善 (Fig. 7A and B)。另一方面，b 波的implicit time受損傷影響而減低，但此現象均可受DBL處理後，而有所改善 (Fig. 7B)。統整上述 ERG 實驗成果顯示，DBL明顯具有改善藍光損傷視網膜功能的特殊療效。

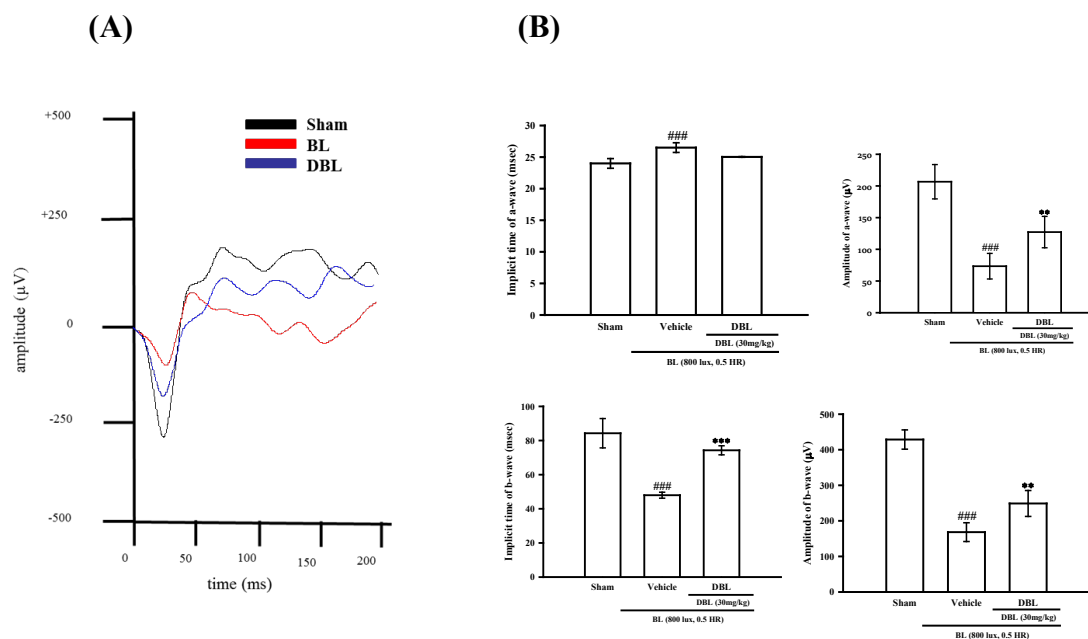
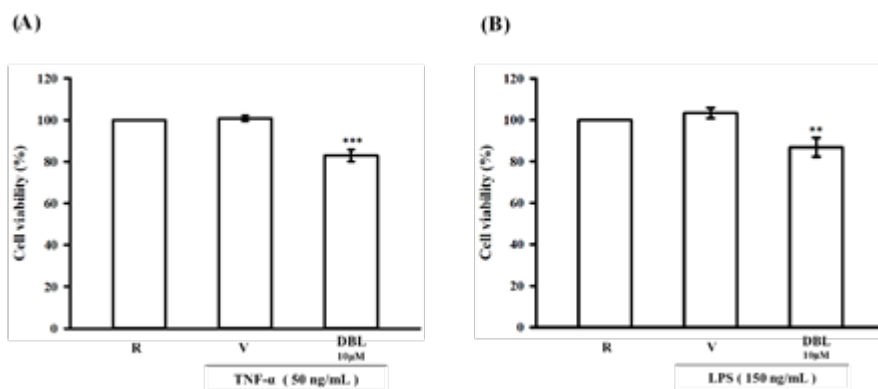
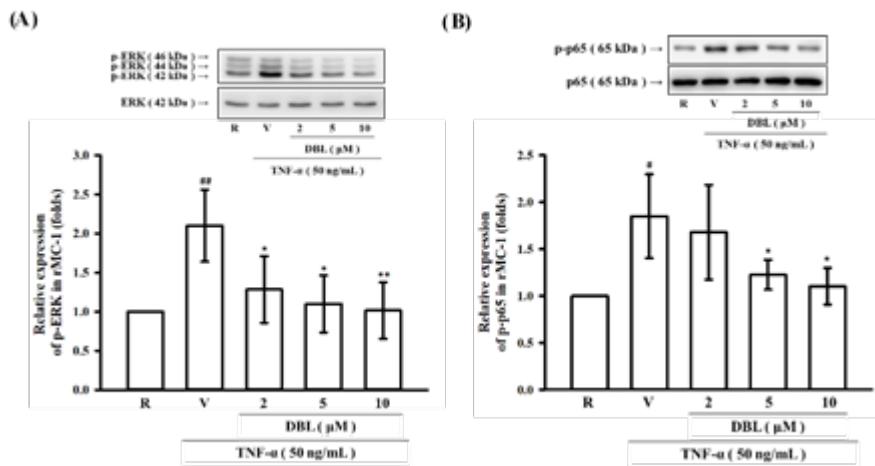


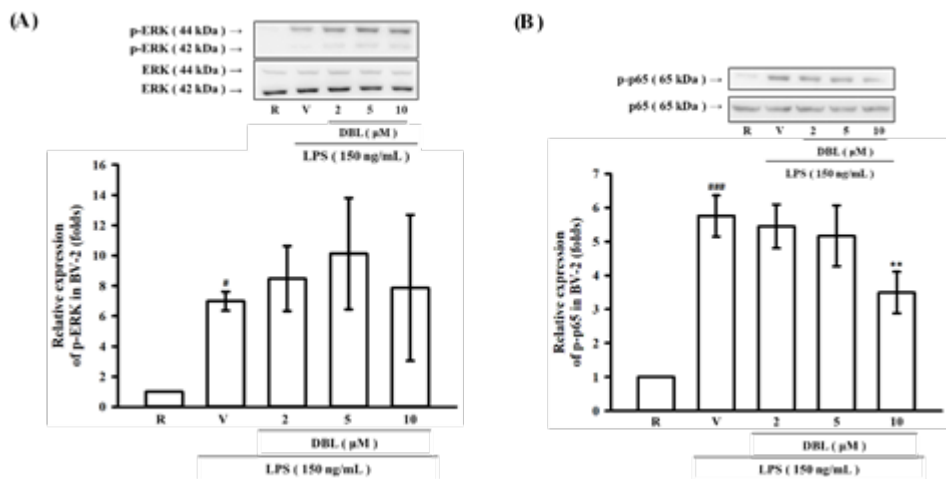
Figure 7. Effects of DBL on blue light-induced functional defects in mice. Control mice were triggered irradiation of blue light (800 lux) for 0.5 h or pretreated with DBL (30 mg/kg). After 6 h, scotopic electroretinogram (ERG) responses of a and b-waves elicited by light at an intensity of $19.1 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ were recorded (A and B). The results were expressed as the mean \pm SD. ### $p < 0.001$ as compared with the resting. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ as compared with the vehicle under BL (n=4).



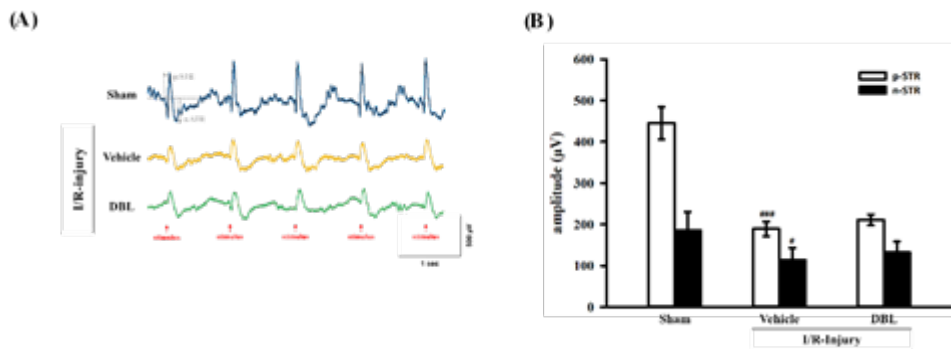
Supplementary Figure 1. Cytotoxicity of DBL on rMC-1 and microglial BV-2 cells. (A) rMC-1 cells (1×10^6 cells/mL) and (B) BV-2 cells (1×10^6 cells/mL) were dispensed into 24-well plate and treated with DBL (10 μM) or vehicle for 24 hrs. Cell viability was determined by MTT dye uptake method. Data represents means \pm SD of 3 independent experiments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to resting condition.



Supplementary Figure 2. Effects of DBL on TNF- α -induced phosphorylation of ERK and p65 in Muller cells. The Muller cells (1×10^6 cells/ml) were dispensed on 6-well plates and treated with TNF- α (50 ng/ml). The Muller cells were pretreated with DBL (2, 5 and 10 μ M) or vehicle for 30 minutes before treatment with TNF- α . The cell lysates were obtained and analyzed for phosphorylated ERK and p65 proteins by Western blots, respectively. The results were expressed as the mean \pm SD. ([#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$ as compared with the resting. ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.05$ as compared with the LPS, $n = 3$).



Supplementary Figure 3. Effects of DBL on LPS-induced phosphorylation of ERK and p65 in microglial BV-2. BV-2 cells (1×10^6 cells/ml) were dispensed on 6-well plates and treated with LPS (150 ng/ml). The BV-2 cells were pretreated with DBL (2, 5 and 10 μ M) or vehicle for 30 minutes before treatment with LPS (150 ng/ml). The cell lysates were obtained and analyzed for phosphorylated ERK and p65 proteins by Western blots, respectively. The results were expressed as the mean \pm SD. ([#] $p < 0.05$, ^{###} $p < 0.001$ as compared with the resting. ^{**} $p < 0.05$ as compared with the LPS, $n = 3$).



Supplementary Figure 4. The effect of DBL on the retinal function of the scotopic threshold response (STR) after high IOP-induced I/R-injury.

(A) Examples of representative STR from the sham control rat (blue curve) and I/R-injured rat treated with vehicle (red curve), or DBL (30 mg/kg) (green curve) were detected 48 h after I/R-injury. The amplitude of positive STR (pSTR) was measured from baseline to the first positive peak. Negative STR (nSTR) amplitude was measured from baseline to the first trough after pSTR and presented as the absolute value. Five continuous responses were recorded after light stimulus with an interstimulus interval of 1 s. (B) The amplitudes of pSTR and nSTR were averaged and quantified. I/R: ischemia-reperfusion. The results were expressed as the mean±SD from 4 animals. ### $p<0.001$ compared with the sham control group; * $p<0.05$ compared with I/Rinjured group treated with vehicle.

Discussion

青光眼的主要症狀之一為視野缺損(visual field defects)，通常與視網膜神經節細胞(retinal ganglion cells, RGC)與其軸突延伸出的視神經纖維層(nerve fiber layer)的損傷有關(Johnson et al., 2009)。為了評估真菌成份DBL是否可以保護視網膜功能，本研究以高眼壓造成大鼠視網膜I/R-injury損傷後48小時，運用視網膜電波圖儀器(electroretinogram, ERG)測量 Scotopic threshold response (STR) 和 Scotopic response。STR的電生理訊號源自於內層視網膜(inner retina)的神經元，主要反映視網膜神經節細胞的完整性(integrity) (Saszik et al., 2002)。除RGC功能喪失(dysfunction)外，在一青光眼動物實驗中(Georgiou et al., 2013)還觀察到視網膜外層(outer retina)中感光細胞(photoreceptors)和雙極細胞(bipolar cells)的喪失，並伴隨著桿-錐細胞聯合反應(rod-cone response, 即是 Scotopic response)的a波和b波振幅降低。由於rod cell的數量遠遠超過cone cell，因此Scotopic ERG 的a波由rod cell的反應主導，而b波則由rod cell與bipolar cell的反應聯合主導(Wachtmeister et al., 1998)。因此也有學者將Scotopic response視為反映感光細胞中rod細胞功能與完整性的ERG方法。根據本研究的實驗結果，特別地，雖然DBL對於STR ERG沒有回覆的作用，但在Scotopic ERG量測，卻顯著地回復了a波與b波，說明藥物DBL對於高眼壓造成的感光細胞層損傷具有保護作用。

雖然目前臨床上青光眼是以RGC細胞的喪失為主要特徵，但也有研究指出，在青光眼患者的視網膜中，位於黃斑部(macula)的感光細胞數量會減少，與患者的視野檢查(hemi-field

visual field)結果相符(Portia et al., 2014)。而在另一篇以恆河猴(rhesus monkeys)為實驗對象的青光眼研究中(Nork et al., 2000)，則發現以雷射破壞樑小管(laser trabecular destruction)方式誘導的高眼壓，並不會造成感光細胞的數量減少，但會使細胞不正常的腫脹(Swelling)。此外，其他文獻研究顯示，運用視網膜斷層掃描成像(Optical Coherence Tomography, OCT)的分析，發現青光眼患者的視網膜OS與RPE層(outer segment & retinal pigment epithelium layer)會明顯變薄，與患者降低的視覺敏感度(visual sensitivity)具有統計上的關聯性(Asaoka et al., 2017)。綜合上述文獻的探討，說明感光細胞層在青光眼之高眼壓損傷下，會影響其數量、功能或結構，而本實驗使用之DBL劑量雖然沒有在ERG分析中展現保護RGC細胞的作用，但仍能明顯回復感光細胞層的電生理波，顯示DBL對於高眼壓造成之視網膜損傷具有一定療效。

在近年的研究發現，許多的真菌類萃取物展現出抗發炎作用，而這些藥用或食用真菌的活性成分，也經證實能透過抑制不同類型的發炎性介質，而具有抗發炎活性(Elsayed et al., 2014; Muszyńska et al., 2018)。本研究使用之藥物DBL是萃取自桑黃(*Phellinus linteus*)的子實體(fructing body)之中的一種活性成分。DBL在LPS誘導的小鼠肺損傷實驗中，能通過抑制TLR4和PI3K/AKT的表現量，抑制MAPK和NF- κ B路徑的活化(Chao et al., 2017)，DBL具顯著抑制iNOS、COX-2、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MMP-2和MMP-9的蛋白質表現量。在本研究案中，根據大鼠眼內MMP-9分析之實驗結果，顯示真菌成分DBL能顯著降低高眼壓誘導之前房液MMP-9活性及視網膜內MMP-9表現量。MMP-9為病理發炎反應性指標，且青光眼往往會伴隨著眼部MMP-9表達的增加(Zaleska et al., 2019)，且MMP-9會參與小樑網(Trabecular meshwork, TM)的組織重塑(remodeling)，進而影響房水的流出(Bradley et al., 1998; De Groef et al., 2016)。因此抑制MMP-9在眼部過高的活性與表現量，可能有助於減緩青光眼症狀。針對MMPs與青光眼的系統性回顧文獻提出了臨床上的一類降眼壓藥物prostaglandin analog/prostamide (PGA)可能會在較高劑量下促使MMP-9表現量的調整(Weinreb et al., 2020)，此研究結果更突顯DBL用於抗視網膜發炎的潛力。

青光眼是一種漸進式的神經退化性疾病，經常導致不可逆轉的失明(irreversible blindness)。青光眼臨床藥物雖以降眼壓的眼藥水為主，但儘管進行治療，仍然有部分患者青光眼而失明。諸如Hattenhauer et al., (1998)等研究顯示，接受治療的青光眼患者中，單眼失明的患者達到20至27%，雙眼失明則有9%。可見目前的藥物仍有不足之處。因此，除了降眼壓目標之外的開發青光眼治療藥物就顯得尤為重要，例如神經保護。神經保護是指有別於降低IOP並保護RGC細胞的一種療法(Almasieh et al. 2012; Chang & Goldberg 2012, Danesh-Meyer 2011)，通過保持RGC的生理功能，維持正常的視覺功能和視網膜結構(Almasieh et al. 2012)。近年兩個視神經保護藥物臨床試驗，分別是Memantine 與Brimonidine，但最後皆因療效不佳導致臨床試驗失敗(Hare et al., 2004a,b; Cordeiro & Levin 2011)。近年有愈來愈多研究顯示視網膜神經膠質在青光眼的重要性，特別是Muller cells (Vecino et al., 2016)。Muller cell能通過釋放抗氧化物質和生長因子並運輸神經介質，在保護RGC中起著重要作用(Vecino et al., 2016)。也有研究認為Muller cell參與了NMDA誘導的RGC興奮性毒性死亡(Lebrun-Julien et al., 2009)。雖然並非每位青光眼患者都會伴隨著發炎的症狀，但視網膜膠質細胞會釋放促發炎因子誘導RGC死亡，而通過抑制Muller細胞活化顯著改善了青光眼的RGC存活率(Cueva Vargas et al. 2016)。因此，以抑制神經膠細胞為目標發展具神經保護作用的抗青光眼藥物為可行之策略。

在許多視網膜疾病中，STAT3的活化都有參與在病理機制中。例如視網膜的異常血管

新生(Retinal Vascularization)(Wang et al., 2012)、增生性視網膜病變(proliferative retinopathy)(Mechoulam et al., 2005)以及感光細胞的退化(photoreceptor degeneration)(Mechoulam et al., 2005)。根據過往的研究顯示，STAT3的磷酸化主要是由IL-6所誘發活化，IL-6 / STAT3信號傳導途徑以及其他炎性細胞因子(例如IL-1 β , IL-23與TNF- α)牽涉到許多腫瘤的癌症進展中(West et al., 2018)。但在本研究中，卻發現Müller細胞在TNF- α (50 ng/mL)刺激會導致STAT3的磷酸化，而實驗結果也顯示藥物DBL抑制發炎的作用也與抑制STAT的磷酸化有關。表明STAT3在Müller細胞發炎反應中有著重要意義。在魚類視網膜中，Müller細胞具備幹細胞特性，對於視網膜的再生有重要作用。有文獻顯示(Nelson et al., 2013)，視網膜垂死的神經元會釋放TNF- α ，而TNF- α 對Müller增加Stat3表達是必需的，而STAT3上升也是Müller膠質細胞增生重要的訊息之一。

關於DBL應用於神經保護方面的研究，有文獻探討DBL對帕金森氏症(Parkinson's Disease, PD)相關的神經毒素6-羥基多巴胺(6-OHDA)的作用(Gunjima et al., 2014)。在人類神經母細胞瘤細胞株SH-SY5Y中，DBL濃度依賴性地提高了以6-OHDA預處理的細胞存活率。DBL能促進Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2)的入核作用，活化Nrf2依賴性抗氧化基因(Nrf2-dependent antioxidative genes)的轉錄，並增加細胞中穀胱甘肽(glutathione)的合成。而調控Muller cells的NRF2也可能在青光眼中改善RGC的存活率(Navneet et al., 2019)。在本篇研究中，雖未探討DBL對於Nrf2之作用，但根據先前文獻，DBL在大鼠之高眼壓損傷中或許能透過促進Nrf2入核，影響MMP-9表現量(Mao et al., 2010)，而達到保護視網膜的作用，惟此部分仍有待研究釐清。

四、研究結論 Conclusions

在本研究中證實，由藥用真菌桑黃 (*Phellinus linteus*) 萃取之天然活性成分3,4-dihydroxybenzalacetone (DBL)，在 TNF- α 與 LPS 誘導之 Muller 與 BV-2 細胞過度活化中具有明顯抑制作用。不論是在 rMC-1 的 extracellular MMP-9 activity 或在 BV-2 的 NO production 都呈現明顯的降低。在訊息路徑的探討中，DBL 主要可藉由訊息 STAT3 磷酸化的抑制作用，以緩解在 TNF- α 誘發 Muller cells 與 LPS 誘發 microglia 活化所產生的 MMP-9 與 iNOS 表現。DBL 仍可能在細胞內具有其他的作用位點，需要再進一步的釐清。另外，在動物實驗的部分，雖然 DBL(30 mg/kg)劑量對眼內 MMP-9 呈現顯著的抑制作用，同時在 ERG 的實驗結果中，對視網膜中的感光細胞層(photoreceptor)具有保護作用。但對其他視網膜神經節細胞層(Retinal ganglion cell layer)之電生理損傷並未有顯著保護作用，此結果仍有待未來探討與研究。特別是 DBL 對藍光之視網膜損傷具有保護作用。本研究成果可作為新型的緩解青光眼等視網膜退化性損傷疾病之治療參考。

五、計畫結果自評

5.1. 本年度研究計畫案利用視網膜穆勒細胞(Muller cells)與小神經膠細胞評估真菌成份(fungal compounds)對青光眼有關視網膜疾病其病理活化發炎物質的改善療效，進而開發相關視網膜保護及抗發炎成分與釐清相關作用機制。本研究報告成果尤其運用大鼠視網膜穆勒(Muller cells)與小神經膠細胞(BV-2 cells)評估真菌成份 DBL 對 TNF- α 誘發致炎物質 MMP-9 表現的抑制效果與機制。另一方面，以高眼壓與進行活體青光眼模式實驗，評估其療效與運用的契機。在研究期間實驗發現 DBL 在活體視網膜神經發炎病理具有改善保護作用，也對發炎蛋白 MMP-9 與 iNOS 的表現，其訊息傳遞的抑制皆有其特殊作用性。根據實驗成果，將投稿一篇有關青光眼治療文章。另外，針對中藥來源真菌目前也已篩選出多種活性成分，其中包含緩解視網膜 Muller 膠細胞活化作用與抗小神經膠細胞活化之抗發炎成

分(如 DC)，並運用於青光眼或藍光損傷治療。本期第三年期計畫進行期間，相關研究助理、博士生及大學部學生接受許多實驗訓練、也積極參與研討會，這些研究經驗相信對未來的視網膜退化疾病治療有良好的助益及提升研究交流。

5.2. 本多年期三年研究計畫案成果上運用人類單核球(THP-1 cells)、人類視網膜色素上皮細胞(ARPE-19 cells)、穆勒膠細胞(rMC-1)與小神經膠細胞(BV-2)評估真菌衍生物(fungal compounds)對各種視網膜疾病其病理活化發炎物質的緩解效果，進而開發相關視網膜保護成分與釐清相關機制。另一方面，結合文獻研究，以設立與進行活體青光眼、NaIO₃ 誘發乾式 AMD 與藍光損傷等模式實驗，評估其療效與運用的契機。整體以視網膜發炎導向疾病之研究為成果，以下分為三大部分：(一)眼科重點研究成果在視網膜神經發炎相關疾病，以視網膜損傷與治療機制為主要成果，如(1)針對藍光傷害進行視網膜病理變化研究，運用已設立疾病模式(LED 藍光傷害)以探討與釐清內在病理因子 A2E 在視網膜細胞損傷凋亡作用及其與藍光惡化視網膜功能的機制(*Int J Mol Sci.*, 20: E1799, 2019/4)。探討改善藍光損傷之成分開發與研究(*Molecules*, 26: 4359, 2021)、(2)與美國喬治亞州 Augusta university 合作，針對 RAS 系統與視網膜疾病之交互作用，進行探討釐清 soluble epoxide hydrolase (sEH)在 AT1 接受體活化造成發炎作用及視網膜損傷的對應角色與機制，其中以 sEH 基因剔除(KO)及螢光血管攝影(fluorescein angiograms)等特殊研究加上細胞分子方法獲得突破之重要病理與治療成果(*Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 148: 106449, 2020/4; *Antioxidant* 9: 520, 2020)、(3)針對高眼壓(glaucoma)傷害進行視網膜病理變化研究，運用高眼壓疾病模式(青光眼)，也利用上述方法確認相關病理分子機制，探討新型真菌天然物藥物 LC53 療效與單核球作用，也獲得相當重要的治療成果與機制(*Phytomedicine*, 56: 207-214, 2019/3)。同時也完成運用視網膜穆勒細胞進行真菌成份 DBL 改善青光眼之療效與機制研究(*in preparation*, 2021/10)、(4)另一方面，以 NaIO₃ 誘發小鼠 dry form-like AMD，以探討真菌衍生物 TLB 在視網膜 RPE 細胞抗活化發炎作用及改善視網膜損傷的機制，其中以視網膜斷層掃描(OCT)及電生理電壓(ERG)等特殊研究加上細胞交互作用與分子訊息方法已獲得突破之重要成果(*in preparation*, 2021/11)。(二)腦部發炎疾病治療及機制研究，以神經發炎(Neuroinflammation)為重心，完成相關研究成果，其中包括 HDAC8 抑制劑(WK2-16)、海洋真菌天然物(Hirsutanol A)及樟芝 EK100 成分等對腦部發炎緩解改善之成果及保護腦部損傷機制之釐清。特別地，針對發炎細胞(如小神經膠細胞及單核球)進行抗發炎活化之藥物作用(MMP-9/iNOS/COX-2/TNF- α 等)及機轉探討(NF κ B/JNK/Akt/ER/STATs 等)，同樣有相當豐富之成果(*Int J Mol Sci.* 20: E410, 2019/1; *Mar Drugs.* 17: E360, 2019/6; *Molecules*, 26: 2970, 2021)。(三)針對單核球發炎介質 MMP-9 與小神經膠細胞 iNOS 之抗發炎之系列衍生藥物研究，因為上述酵素異常表現為視網膜及腦部疾病的重要傷害性發炎介質，本實驗室與其他藥物研究領域均有重要合作研究成果，針對海洋與陸生真菌衍生物之抗發炎活性有系列性之研究成果 (*JFDA*, 28: 283-291, 2020/5; *Bot Stud.*, 62: 18, 2021; *J Nat Prod.*, 84: 1898-1903, 2021; *Molecules*, 26: 2537, 2021)。整體研究成果除了釐清視網膜與腦部相關發炎病理角色，也部分提供相關疾病模式運用之參考，更提供新型真菌成分在視網膜治療機制之新方向。本三年期計畫進行期間，相關研究助理、博士生及大學部學生接受許多實驗訓練，也獲得大專生計畫(2021-2022)。指導研究生積極參與研討會，這些研究經驗相信對本實驗室未來的視網膜退化疾病治療有良好的助益及提升研究能量，同時也由衷感謝科技部研究經費支持。

六、參考文獻

Agapova OA, Ricard CS, Salvador-Silva M, Hernandez MR. Expression of matrix

metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human optic nerve head astrocytes. *Glia*. 2001;33(3):205-16

- Almasieh M**, Wilson AM, Morquette B, Cueva Vargas JL, Di Polo A. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res*. 2012 Mar;31(2):152-81.
- Asaoka R**, Murata H, Yanagisawa M, Fujino Y, Matsuura M, Inoue T, Inoue K, Yamagami J. The association between photoreceptor layer thickness measured by optical coherence tomography and visual sensitivity in glaucomatous eyes. *PLoS One*. 2017 Oct 12;12(10):e0184064.
- Beg AA**, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*. 1996 Nov 1;274(5288):782-4.
- Bosco A**, Inman DM, Steele MR, Wu G, Soto I, Marsh-Armstrong N, Hubbard WC, Calkins DJ, Horner PJ, Vetter ML. Reduced retina microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Apr;49(4):1437-46.
- Bradley JM**, Vranka J, Colvis CM, Conger DM, Alexander JP, Fisk AS, Samples JR, Acott TS. Effect of matrix metalloproteinases activity on outflow in perfused human organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998 Dec;39(13):2649-58.
- Calkins DJ**, Horner PJ. The cell and molecular biology of glaucoma: axonopathy and the brain. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 May 4;53(5):2482-4.
- Carswell EA**, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(9):3666-3670.
- Chao W**, Deng JS, Li PY, Liang YC, Huang GJ. 3,4-Dihydroxybenzalactone Suppresses Human Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells Metastasis via Suppression of Epithelial to Mesenchymal Transition, ROS-Mediated PI3K/AKT/MAPK/MMP and NFκB Signaling Pathways. *Molecules*. 2017;22(4):537.
- Chao W**; Deng J.S.; Huang S.S.; Li P.Y.; Liang Y.C.; Huang G.J. 3, 4-dihydroxybenzal-acetone attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury via down-regulation of MMP-2 and MMP-9 activities through suppressing ROS-mediated MAPK and PI3K/AKT signaling pathways. *Int. Immunopharmacol*. 2017, 50, 77–86.
- Chi W**, Li F, Chen H, Wang Y, Zhu Y, Yang X, Zhu J, Wu F, Ouyang H, Ge J, Weinreb RN, Zhang K, Zhuo Y. Caspase-8 promotes NLRP1/NLRP3 inflammasome activation and IL-1β production in acute glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jul 29;111(30):11181-6.
- Choi, D.J.**; Cho, S.; Seo, J.Y.; Lee, H.B.; Park, Y. Neuroprotective effects of the *Phellinus linteus* ethyl acetate extract against H₂O₂-induced apoptotic cell death of SK-N-MC cells. *Nutr. Res*. 2016, 36, 31–43.
- Cybulska-Heinrich AK**, Mozaffarieh M, Flammer J. Ginkgo biloba: an adjuvant therapy for progressive normal and high tension glaucoma. *Mol Vis*. 2012;18:390-402.
- De Groef L**, Andries L, Siwakoti A, Geeraerts E, Bollaerts I, Noterdaeme L, Etienne I, Papageorgiou AP, Stalmans I, Billen J, West-Mays JA, Moons L. Aberrant Collagen Composition of the Trabecular Meshwork Results in Reduced Aqueous Humor Drainage and Elevated IOP in MMP-9 Null Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Nov 1;57(14):5984-5995.
- De Groef L**, Van Hove I, Dekeyster E, Stalmans I, Moons L. MMPs in the neuroretina and optic nerve: modulators of glaucoma pathogenesis and repair? *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Mar 28;55(3):1953-64.
- Dvoriantschikova G**, Barakat DJ, Hernandez E, Shestopalov VI, Ivanov D. Toll-like receptor 4 contributes to retinal ischemia/reperfusion injury. *Mol Vis*. 2010; 16: 1907-1912.
- Eichler W**, Savković-Cvijić H, Bürger S, Beck M, Schmidt M, Wiedemann P, Reichenbach A, Unterlauff JD. Müller Cell-Derived PEDF Mediates Neuroprotection via STAT3 Activation. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(4):1411-1424
- Elsayed E.A.**; El Enshasy, H.; Wadaan, M.A.; Aziz, R. Mushrooms: A potential natural source of

antiinflammatory compounds for medical applications. *Mediat. Inflamm.* 2014, 2014, 805841–805855.

- Fernandez-Lizarbe** S, Pascual M, Guerri C. Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *J Immunol.* 2009 Oct 1;183(7):4733-44.
- Fernández-Sánchez** L, Lax P, Noailles A, Angulo A, Maneu V, Cuenca N. Natural Compounds from Saffron and Bear Bile Prevent Vision Loss and Retinal Degeneration. *Molecules.* 2015;20(8):13875-93
- Georgiou** A.L., Guo, L., Francesca Cordeiro, M., Salt, T.E., 2013. Electroretinogram and visual-evoked potential assessment of retinal and central visual function in a rat ocular hypertension model of glaucoma. *Curr. Eye Res.* 39, 472–486.
- Giridharan** VV, Karupppagounder V, Arumugam S, Nakamura Y, Guha A, Barichello T, Quevedo J, Watanabe K, Konishi T, Thandavarayan RA. 3,4-Dihydroxybenzalacetone (DBL) Prevents Aging-Induced Myocardial Changes in Senescence-Accelerated Mouse-Prone 8 (SAMP8) Mice. *Cells.* 2020 Mar 3;9(3):597..
- González-Scarano** F, Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci.* 1999;22:219-40.
- Gunjima** K, Tomiyama R, Takakura K, Yamada T, Hashida K, Nakamura Y, Konishi T, Matsugo S, Hori O. 3,4-dihydroxybenzalacetone protects against Parkinson's disease-related neurotoxin 6-OHDA through Akt/Nrf2/glutathione pathway. *J Cell Biochem.* 2014 Jan;115(1):151-60.
- He** S, Stankowska DL, Ellis DZ, Krishnamoorthy RR, Yorio T. Targets of Neuroprotection in Glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2018 Jan/Feb;34(1-2):85-106.
- Heitmar** R, Brown J, Kyrou I. Saffron (*Crocus sativus* L.) in Ocular Diseases: A Narrative Review of the Existing Evidence from Clinical Studies. *Nutrients.* 2019 Mar 18;11(3):649.
- Hijova** E. Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratisl Lek Listy.* 2005;106(3):127-32.
- Hollands** H, Johnson D, Hollands S, Simel DL, Jinapriya D, Sharma S. Do findings on routine examination identify patients at risk for primary open-angle glaucoma? *JAMA.* 2013;309(19):2035-2042.
- Hooks** JJ, Nagineni CN, Hooper LC, Hayashi K, Detrick B. IFN-beta provides immuno-protection in the retina by inhibiting ICAM-1 and CXCL9 in retinal pigment epithelial cells. *J Immunol.* 2008;180(6):3789-3796.
- Huang**, S.C.; Wang, P.W.; Kuo, P.C.; Hung, H.Y.; Pan, T.L. Hepatoprotective principles and other chemical constituents from the mycelium of *Phellinus linteus*. *Molecules* 2018, 23, 1705.
- Hwang**, B.S.; Lee, M.S.; Lee, S.W.; Lee, I.K.; Seo, G.S.; Choi, H.J.; Yun, B.S. Neuraminidase inhibitors from the fermentation broth of *Phellinus linteus*. *Mycobiology* 2014, 42, 189–192.
- Johnson** EC, Morrison JC. Friend or foe? Resolving the impact of glial responses in glaucoma. *J Glaucoma.* 2009 Jun-Jul;18(5):341-53.
- Jorstad** NL, Wilken MS, Todd L, Finkbeiner C, Nakamura P, Radulovich N, Hooper MJ, Chitsazan A, Wilkerson BA, Rieke F, Reh TA. STAT Signaling Modifies Ascl1 Chromatin Binding and Limits Neural Regeneration from Muller Glia in Adult Mouse Retina. *Cell Rep.* 2020 Feb 18;30(7):2195-2208.e5.
- Kagan** JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol.* 2008 Apr;9(4):361-8.
- Kang** JM, Lin S. Ginkgo biloba and its potential role in glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol.* 2018;29(2):116-120
- Kang**, H.S.; Choi, J.H.; Cho, W.K.; Park, J.C.; Choi, J.S. A sphingolipid and tryrosinase inhibitors from the fruiting body of *Phellinus linteus*. *Arch. Pharm. Res.* 2004, 27, 742–750.
- Kawasaki** T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014 Sep 25;5:461.

- Ko MK**, Saraswathy S, Parikh JG, Rao NA. The role of TLR4 activation in photoreceptor mitochondrial oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(8):5824-5835.
- Kojima**, K.; Ohno, T.; Inoue, M.; Mizukami, H.; Nagatsu, A. Phellifuropyranone A: A new furopyranone compound isolated from fruit bodies of wild *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull*. 2008, 56, 173–175.
- Kong**, S.Z.; Li, J.C.; Li, S.D.; Liao, M.N.; Li, C.P.; Zheng, P.J.; Guo, M.H.; Tan, W.X.; Zheng, Z.H.; Hu, Z. Anti-aging effect of chitosan oligosaccharide on D-galactose-induced subacute aging in mice. *Mar. Drugs* 2018, 16, 181.
- Lebrun-Julien** F, Duplan L, Pernet V, Osswald I, Sapiha P, Bourgeois P, Dickson K, Bowie D, Barker PA, Di Polo A. Excitotoxic death of retinal neurons in vivo occurs via a non-cell-autonomous mechanism. *J Neurosci*. 2009 Apr 29;29(17):5536-45.
- Lehnardt** S, Massillon L, Follett P, et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8514-8519.
- Lin** CJ, Lien HM, Lin HJ, et al. Modulation of T cell response by *Phellinus linteus*. *J Biosci Bioeng*. 2016;121(1):84-88.
- Lin** FL, Cheng YW, Yu M, et al. The fungus-derived retinoprotectant theissenolactone C improves glaucoma-like injury mediated by MMP-9 inhibition. *Phytomedicine*. 2019
- Lin** FL, Ho JD, Cheng YW, et al. Theissenolactone C Exhibited Ocular Protection of Endotoxin-Induced Uveitis by Attenuating Ocular Inflammatory Responses and Glial Activation. *Front Pharmacol*. 2018
- Lin** FL, Lin CH, Ho JD, et al. The natural retinoprotectant chrysophanol attenuated photoreceptor cell apoptosis in an N-methyl-N-nitrosourea-induced mouse model of retinal degeneration. *Sci Rep*. 2017;7:41086.
- Luo** C, Yang X, Kain AD, Powell DW, Kuehn MH, Tezel G. Glaucomatous tissue stress and the regulation of immune response through glial Toll-like receptor signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Nov;51(11):5697-707.
- Manthey** AL, Chiu K, So KF. Effects of *Lycium barbarum* on the Visual System. *Int Rev Neurobiol*. 2017;135:1-27.
- Mao** L, Wang H, Qiao L, Wang X. Disruption of Nrf2 enhances the upregulation of nuclear factor-kappaB activity, tumor necrosis factor- α , and matrix metalloproteinase-9 after spinal cord injury in mice. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:238321.
- McLaren** NC, Moroi SE. Clinical implications of pharmacogenetics for glaucoma therapeutics. *Pharmacogenomics J*. 2003; 3: 197–201.
- Meng** X, Liang H, Luo L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydr Res*. 2016;424:30-41.
- Muszyńska**, B.; Grzywacz-Kisielewska, A.; Kała, K.; Gdula-Argasińska, J. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. *Food. Chem*. 2018, 243, 373–381.
- Nakajima** Y, Nishida H, Matsugo S, Konishi T. Cancer cell cytotoxicity of extracts and small phenolic compounds from Chaga [*Inonotus obliquus* (persoon) Pilat]. *J Med Food*. 2009 Jun;12(3):501-7.
- Nakajima** Y, Sato Y, Konishi T. Antioxidant small phenolic ingredients in *Inonotus obliquus* (persoon) Pilat (Chaga). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2007 Aug;55(8):1222-6.
- Navneet** S, Zhao J, Wang J, et al. Hyperhomocysteinemia-induced death of retinal ganglion cells: The role of Müller glial cells and NRF2. *Redox Biol*. 2019;24:101199.
- Nelson** CM, Ackerman KM, O'Hayer P, Bailey TJ, Gorsuch RA, Hyde DR. Tumor necrosis factor-alpha is produced by dying retinal neurons and is required for Muller glia proliferation during zebrafish retinal regeneration. *J Neurosci*. 2013; 33(15): 6524-6539.
- Nguyen** QH. Combination of brinzolamide and brimonidine for glaucoma and ocular hypertension: critical appraisal and patient focus. *Patient Prefer Adherence*. 2014; 8: 853-864.
- Nork** TM, Ver Hoeve JN, Poulsen GL, et al. Swelling and loss of photoreceptors in chronic

human and experimental glaucomas. *Arch Ophthalmol.* 2000;118(2):235-245.

- Opdenakker G**, Abu El-Asrar A. Metalloproteinases mediate diabetes-induced retinal neuropathy and vasculopathy. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(16):3157-3166.
- Page-McCaw A**, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Mar;8(3):221-33.
- Pescosolido N**, Giannotti R, Plateroti AM, Pascarella A, Nebbioso M. Curcumin: therapeutical potential in ophthalmology. *Planta Med.* 2014;80(4):249-54
- Prasanna G**, Krishnamoorthy R, Yorio T. Endothelin, astrocytes and glaucoma. *Exp Eye Res.* 2011 Aug;93(2):170-7.
- Qin L**, Li G, Qian X, Liu Y, Wu X, Liu B, Hong JS, Block ML. Interactive role of the toll-like receptor 4 and reactive oxygen species in LPS-induced microglia activation. *Glia.* 2005 Oct;52(1):78-84.
- Quigley HA**, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol.* 2006;90(3):262-267.
- Quigley HA.** New paradigms in the mechanisms and management of glaucoma. *Eye (Lond).* 2005 Dec;19(12):1241-8.
- Robert MC**, Arafat SN, Spurr-Michaud S, Chodosh J, Dohlman CH, Gipson IK. Tear Matrix Metalloproteinases and Myeloperoxidase Levels in Patients With Boston Keratoprosthesis Type I. *Cornea.* 2016;35(7):1008-1014.
- Rojas B**, Gallego BI, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM. Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. *J Neuroinflammation.* 2014 Jul 26;11:133.
- Sambhara DS**, Aref AA. Glaucoma management: relative value and place in therapy of available drug treatments. *Ther Adv Chronic Dis* 2014; 5: 30–43.
- Saszik SM**, Robson JG, Frishman LJ. The scotopic threshold response of the dark-adapted electroretinogram of the mouse. *J Physiol.* 2002 Sep 15;543(Pt 3):899-916.
- Saszik SM**, Robson JG, Frishman LJ. The scotopic threshold response of the dark-adapted electroretinogram of the mouse. *J Physiol.* 2002 Sep 15;543 (Pt 3): 899-916.
- Shohami E**, Ginis I, Hallenbeck JM. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999 Jun;10(2):119-30.
- Sigireddi RR**, Frankfort BJ. Neuroprotection in Glaucoma. *Int Ophthalmol Clin.* 2018 Summer;58(3):51-67.
- Silverman SM**, Wong WT. Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. *Annu Rev Vis Sci.* 2018 Sep 15;4:45-77.
- Singhal S**, Lawrence JM, Salt TE, Khaw PT, Limb GA. Triamcinolone attenuates macrophage/microglia accumulation associated with NMDA-induced RGC death and facilitates survival of Müller stem cell grafts. *Exp Eye Res.* 2010 Feb;90(2):308-15.
- Sommer A.** Collaborative normal-tension glaucoma study. *Am J Ophthalmol.* 1999;128(6):776-777.
- Stein JD**, Ayyagari P, Sloan FA, et al. Rates of glaucoma medication utilization among persons with primary open- angle glaucoma 1992 to 2002. *Ophthalmology* 2008; 115: 1315–1319.
- Stewart EA**, Wei R, Branch MJ, Sidney LE, Amoaku WM. Expression of Toll-like receptors in human retinal and choroidal vascular endothelial cells. *Exp Eye Res.* 2015;138:114-123.
- Tanihara H**, Inoue T, Yamamoto T, et al. One-year clinical evaluation of 0.4% ripasudil (K-115) in patients with open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Acta Ophthalmol.* 2016;94(1):e26-34
- Tezel G**, Chauhan BC, LeBlanc RP, Wax MB. Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(7):3025-3033.
- Tezel G**, Li LY, Patil RV, Wax MB. Tumor necrosis factor-alpha and its receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42:1787–1794.

- Tezel G, Wax MB.** Increased production of tumor necrosis factor-alpha by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. *J Neurosci.* 2000; 20:8693–8700.
- Tezel G, Yang X, Luo C, Kain AD, Powell DW, Kuehn MH, Kaplan HJ.** Oxidative stress and the regulation of complement activation in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Oct;51(10):5071-82.
- Tezel G, Yang X.** Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45:4049–4059.
- Tezel G.** TNF-alpha signaling in glaucomatous neurodegeneration. *Prog Brain Res.* 2008;173:409-21.
- Van der Valk R, Webers CAB, Schouten JS, et al.** Intraocular pressure- lowering effects of all commonly used glaucoma drugs: a meta- analysis of randomized clinical trials. *Ophthalmology* 2005; 112: 1177–1185.
- Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC.** Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res.* 2016
- Vihinen P, Kähäri VM.** Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer.* 2002 May 10;99(2):157-66.
- Wachtmeister L.** Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog Retin Eye Res.* 1998; 17:485–521.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P.** Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003 Jan;10(1):45-65.
- Wang L, Li C, Guo H, Kern TS, Huang K, Zheng L.** Curcumin inhibits neuronal and vascular degeneration in retina after ischemia and reperfusion injury. *PLoS One.* 2011a;6(8):e23194
- Wang M, Li J, Zheng Y.** The Potential Role of Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) in Glaucoma: A Review. *Med Sci Monit.* 2020;26:e921514.
- Wang M, 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.* 2011b;8:173.
- Wang M, Wong WT.** Microglia-Müller cell interactions in the retina. *Adv Exp Med Biol.* 2014b; 801:333-338.
- Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA.** The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *JAMA.* 2014;311(18):1901-1911.
- Weinreb RN, Khaw PT.** Primary open-angle glaucoma. *Lancet.* 2004; 363(9422): 1711-1720.
- Weinreb RN, Robinson MR, Dibas M, Stamer WD.** Matrix Metalloproteinases and Glaucoma Treatment. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2020;36(4):208-228.
- West AJ, Tsui V, Stylli SS, et al.** The role of interleukin-6-STAT3 signalling in glioblastoma. *Oncol Lett.* 2018;16(4):4095-4104.
- Wu Y, Zhou BP.** TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer.* 2010 Feb 16;102(4):639-44.
- Xie, Z.L.; Wang, Y.; Huang, J.Q.; Qian, N.; Shen, G.Z.; Chen, L.H.** Anti-inflammatory activity of polysaccharides from *Phellinus linteus* by regulating the NF- κ B translocation in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Int. Biol. Macromol.* 2019, 129, 61–67.
- Xu WQ, Wang YS.** The role of Toll-like receptors in retinal ischemic diseases. *Int J Ophthalmol.* 2016 Sep 18;9(9):1343-51.
- Yan X, Tezel G, Wax MB, Edward DP.** Matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor alpha in glaucomatous optic nerve head. *Arch Ophthalmol.* 2000 May;118(5):666-73.
- Yuan L, Neufeld AH.** Tumor necrosis factor-alpha: A potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head. *Glia.* 2000; 32:42–50.
- Zaleska-Żmijewska A, Strzemecka E, Wawrzyniak ZM, Szaflik JP.** Extracellular MMP-9-Based Assessment of Ocular Surface Inflammation in Patients with Primary Open-Angle Glaucoma. *J Ophthalmol.* 2019
- Zhu, T.; Kim, S.H.; Chen, C.Y.** A medicinal mushroom: *Phellinus linteus*. *Curr. Med. Chem.* 2008, 15, 1330–1335.

107年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：蕭哲志		計畫編號：107-2320-B-038-025-MY3			
計畫名稱：探討真菌衍生之抗神經發炎成分及其對視網膜疾病之療效評估					
成果項目		量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)	
國內	學術性論文	期刊論文	0	篇	生醫年會與天然藥物年會
		研討會論文	4		
		專書	0	本	
		專書論文	0	章	
		技術報告	0	篇	
		其他	0	篇	
國外	學術性論文	期刊論文	5	篇	Molecules, 26: 4359, 2021; Molecules, 26: 2970, 2021; Bot Stud., 62: 18, 2021; J Nat Prod., 84: 1898-1903, 2021; Molecules, 26: 2537, 2021
		研討會論文	0		
		專書	0	本	
		專書論文	0	章	
		技術報告	0	篇	
		其他	0	篇	
參與計畫人力	本國籍	大專生	2	人次	藥學系二年級 陳廷旻 (今年獲大專生計畫案) 醫學系二年級 洪兆志
		碩士生	0		
		博士生	1		博二 吳亮寰
		博士級研究人員	0		
		專任人員	2		短期任務聘任：顏敬倫、陳俐卉
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	1		博四 越南籍 Phong Do
		博士級研究人員	0		
		專任人員	0		
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。)		1. 協助辦理2021亞太藥理會議籌畫 2. 中醫年會特別演講(4th World Congress and Expo, 臺大醫院國際會議中心, 2021/3/13) 3. 美國喬治亞州Augusta University, 眼科合作			