

國家科學及技術委員會補助專題研究計畫報告

紅藜與其活性成分對LED光源誘發視網膜傷害之保護效應(第2年)

報告類別：成果報告

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSTC 110-2320-B-041-001-MY2

執行期間：111年08月01日至112年12月31日

執行單位：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學食品科技系

計畫主持人：杜平惠

計畫參與人員：學士級-專任助理：陳潔芸

報告附件：出席國際學術會議心得報告

本研究具有政策應用參考價值：☐否 ☒是，建議提供機關經濟部, 農業部, 衛生福利部

(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 112 年 12 月 07 日

中文摘要：本計畫第一年研究旨在探討紅藜(*Chenopodium formosanum*)及其生物活性成分對藍光(BL)誘導視網膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)細胞的抑制作用，並闡明其作用機制。結果顯示，在經過6小時的藍光照射(波峰值為450 nm)，ARPE-19細胞的存活率顯著下降，但以0.1-25 μ g/mL濃度的紅藜水萃取物(water extracts of djulis, WECF)能保護細胞免受藍光誘導的光氧化破壞。此保護作用與抑制藍光誘導的活性氧(ROS)之生成、TBARS含量和caspase-3活性，且增加麩胱甘肽(GSH)含量、粒線體膜電位(MMP)和超氧化物歧化酶(SOD)活性有關。此外，WECF可抑制NF- κ B蛋白的表達和MAPK之訊息路徑，另藉由正向調控Nrf2的途徑而增加HO-1的表達。此外，存在於WECF中的甜菜鹼(betainin)、山奈酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)和芸香苷(rutin)在1-10 μ M濃度且在藍光誘導的AREP-19細胞中可抑制ROS和TBARS形成，另顯著恢復GSH含量，增加SOD活性，而山奈酚與槲皮素可增加Nrf2蛋白表達。綜合上述，WECF及其生物活性成分對藍光誘導的視網膜光氧化損傷具有保護效應。

第二年研究以動物模式為試驗平台，探討WECF及其活性成分之槲皮素與甜菜鹼對LED誘發小鼠視網膜傷害之影響。實驗分兩種模式進行：模式一為先以LED誘發，再管餵待測物。結果顯示，10 mg/kg bw槲皮素、1.0 mg/kg bw甜菜鹼、10 mg/kg bw甜菜鹼與不同濃度之WECF在SOD活性表現優於負控組(NC)，惟在眼球之脂質氧化、GSH含量與視網膜之內核層(INL)、外核層(ONL)、感光器內節與外節(IS&OS)厚度等病理變化並無明顯差異。模式二為在小鼠先管餵待測物後再給予LED誘發試驗模式，其結果顯示，在抗氧化指標、病理組織變化包含ONL與IS&OS厚度上，WECF (100 mg/kg bw)之表現皆優於負控組(NC)，而槲皮素在GSH與抑制脂質氧化以及在IS&OS指標上優於負控組(NC)，而低濃度甜菜鹼則在IS&OS指標上優於負控組(NC)。再者，300 mg/kg bw WECF在視覺敏銳度(VA)與視覺對比敏感度(VCS)表現上具有改善作用。此外，由視網膜電流圖儀(electroretinogram, ERG)之評估結果亦顯示300 mg/kg bw WECF具有保護視網膜作用。基於此，小鼠先行餵予WECF具有預防LED光源誘發視網膜損傷與破壞作用。

整體而言，本研究結果證實紅藜及其生物活性成分對LED光源誘發視網膜傷害具有保護效應，此結果對預防視網膜疾病具有重要參考意義。

中文關鍵詞：紅藜水萃取物；生物活性成分；甜菜鹼；山奈酚；槲皮素；芸香苷；發光二極體；藍光照射；視網膜色素上皮細胞；核因子活化B細胞 κ 輕鏈增強子；絲裂原活化蛋白激酶；核轉錄相關因子；血鐵質氧化酶-1；抗光氧化損傷

英文摘要：The aim of the first year proposal was to provide new insights into the role of the water extracts of Djulis (*Chenopodium formosanum*, WECF) and its bioactive compounds to prevent blue light (BL)-induced retinal damage in ARPE-19 cells. After 6 hours of BL exposure (peak at 450 nm), ARPE-19 cell viability significantly decreased, but

treatment with water extract of djulis (WECF) at 0.1–25 $\mu\text{g/mL}$ protected the cells from BL-induced phototoxicity. The cytoprotective effect of WECF were associated with a decrease in BL-induced oxidative stress and caspase-3 activity, and an increase in GSH levels and SOD activity. WECF also inhibited the expression of NF- κ B protein and the MAPK signaling pathway, while upregulated heme oxygenase-1 (HO-1) via the Nrf2-mediated pathway. In addition, betanin, kaempferol, quercetin and rutin, presented in WECF, at 1–10 μM inhibited ROS generation and TBARS formation, and significantly restored GSH levels, increased SOD activity, and both kaempferol and quercetin at 10 μM significantly increased Nrf2 protein expression in the cell nucleus in blue light-induced AREP-19 cells, compared to the cells treated with blue light alone. Taken together, WECF and its bioactive compounds against blue light-induced retina damage, which could potentially be useful for treating retinal disease.

In the second year of the study, an animal model was used as an experimental platform. The study aimed to investigate the effects of WECF, quercetin (Q) and betanin (B) on LED light-induced retinal damage in mice. The experimental design consisted of two models. In the first model, mice were initially exposed to LED light and subsequently administered the test substances. There were significant differences in superoxide dismutase (SOD) activity between the negative control group (NC) and mice treated with 10 mg/kg bw quercetin, 1.0 mg/kg bw betanin, 10 mg/kg bw betanin, and different concentrations (10, 50, 100 mg/kg bw) of WECF. However, no significant differences in TBARS in the eyeball, glutathione (GSH) content, or pathological changes in the inner nuclear layer (INL), outer nuclear layer (ONL), and inner and outer segments (IS&OS) thickness of the retina were found.

Additionally, in model 2, where mice were first administered the test substances and then exposed to LED light, WECF (100 mg/kg bw) demonstrated superiority over NC in terms of antioxidant indices and pathological tissue changes, including ONL and IS&OS thickness. Quercetin excelled over NC in terms of GSH levels, inhibition of lipid oxidation, and IS&OS indices. Furthermore, low-concentration betanin outperformed NC in the IS&OS indices. Moreover, the administration of 300 mg/kg bw WECF significantly improved visual acuity (VA) and visual contrast sensitivity (VCS) compared to the negative control. Evaluation results from electroretinography (ERG)

also indicated that the 300 mg/kg bw WECF had a protective effect on the retina. These findings suggest that pre-administration of WECF in mice demonstrated preventive effects against LED light-induced retinal damage.

Overall, WECF and its bioactive components have been shown to protect retinal cells from blue light-induced damage. These findings are of significant reference value for the prevention of retinal diseases.

英文關鍵詞：djulis (*Chenopodium formosanum*); betanin; kaempferol; quercetin; rutin; light-emitting diode (LED); blue light irradiation; retinal pigment epithelium (RPE) cells; nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B); mitogen-activated protein kinases (MAPK); nuclear factor erythroid-derived 2-related factor (Nrf2); heme oxygenase-1 (HO-1); anti-photo-oxidative damage

行政院科技部補助專題研究計畫 ☒ 成果報告
☐ 期中報告

紅藜與其活性成分對 LED 光源誘發視網膜傷害之保護效應

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：MOST 110-2320-B-041-001-MY2

執行期間：2021 年 8 月 1 日至 2023 年 12 月 31 日

執行機構及系所：嘉南藥理大學食品科技系

計畫主持人：杜平惠

計畫參與人員：柳景艷、陳師瑩

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：☐ 精簡報告 ☒ 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

☐ 赴國外出差或研習心得報告

☐ 赴大陸地區出差或研習心得報告

☒ 出席國際學術會議心得報告

☐ 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

☐ 涉及專利或其他智慧財產權，☒ 一年☐ 二年後可公開查詢

中 華 民 國 112 年 12 月 6 日

目錄

壹、中文摘要	1
貳、英文摘要	2
參、前言	3
肆、研究方法	4
伍、結果與討論	10
陸、引用文獻	57
柒、附錄:已發表研發成果	59

壹、中文摘要

本計畫第一年研究旨在探討紅藜(*Chenopodium formosanum*)及其生物活性成分對藍光(BL)誘導視網膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)細胞的抑制作用，並闡明其作用機制。結果顯示，在經過 6 小時的藍光照射(波峰值為 450 nm)，ARPE-19 細胞的存活率顯著下降，但以 0.1-25 $\mu\text{g/mL}$ 濃度的紅藜水萃取物(water extracts of djulis, WECF)能保護細胞免受藍光誘導的光氧化破壞。此保護作用與抑制藍光誘導的活性氧(ROS)之生成、TBARS 含量和 caspase-3 活性，且增加麩胱甘肽(GSH)含量、粒線體膜電位(MMP)和超氧化物歧化酶(SOD)活性有關。此外，WECF 可抑制 NF- κ B 蛋白的表達和 MAPK 之訊息路徑，另藉由正向調控 Nrf2 的途徑而增加 HO-1 的表達。此外，存在於 WECF 中的甜菜鹼(betainin)、山奈酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)和芸香苷(rutin)在 1-10 μM 濃度且在藍光誘導的 AREP-19 細胞中可抑制 ROS 和 TBARS 形成，另顯著恢復 GSH 含量，增加 SOD 活性，而山奈酚與槲皮素可增加 Nrf2 蛋白表達。綜合上述，WECF 及其生物活性成分對藍光誘導的視網膜光氧化損傷具有保護效應。

第二年研究以動物模式為試驗平台，探討 WECF 及其活性成分之槲皮素與甜菜鹼對 LED 誘發小鼠視網膜傷害之影響。實驗分兩種模式進行：模式一為先以 LED 誘發，再管餵待測物。結果顯示，10 mg/kg bw 槲皮素、1.0 mg/kg bw 甜菜鹼、10 mg/kg bw 甜菜鹼與不同濃度之 WECF 在 SOD 活性表現優於負控組(NC)，惟在眼球之脂質氧化、GSH 含量與視網膜之內核層(INL)、外核層(ONL)、感光器內節與外節(IS&OS)厚度等病理變化並無明顯差異。模式二為在小鼠先管餵待測物後再給予 LED 誘發試驗模式，其結果顯示，在抗氧化指標、病理組織變化包含 ONL 與 IS&OS 厚度上，WECF (100 mg/kg bw)之表現皆優於負控組(NC)，而槲皮素在 GSH 與抑制脂質氧化以及在 IS&OS 指標上優於負控組(NC)，而低濃度甜菜鹼則在 IS&OS 指標上優於負控組(NC)。再者，300 mg/kg bw WECF 在視覺敏銳度(VA)與視覺對比敏感度(VCS)表現上具有改善作用。此外，由視網膜電流圖儀(electroretinogram, ERG)之評估結果亦顯示 300 mg/kg bw WECF 具有保護視網膜作用。基於此，小鼠先行餵予 WECF 具有預防 LED 光源誘發視網膜損傷與破壞作用。

整體而言，本研究結果證實紅藜及其生物活性成分對 LED 光源誘發視網膜傷害具有保護效應，此結果對預防視網膜疾病具有重要參考意義。

關鍵字：紅藜水萃取物；生物活性成分；甜菜鹼；山奈酚；槲皮素；芸香苷；發光二極體；藍光照射；視網膜色素上皮細胞；核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈增強子；絲裂原活化蛋白激酶；核轉錄相關因子；血鐵質氧化酶-1；抗光氧化損傷

貳、英文摘要

The aim of the first year proposal was to provide new insights into the role of the water extracts of Djulis (*Chenopodium formosanum*, WECF) and its bioactive compounds to prevent blue light (BL)-induced retinal damage in ARPE-19 cells. After 6 hours of BL exposure (peak at 450 nm), ARPE-19 cell viability significantly decreased, but treatment with water extract of djulis (WECF) at 0.1-25 $\mu\text{g/mL}$ protected the cells from BL-induced phototoxicity. The cytoprotective effect of WECF were associated with a decrease in BL-induced oxidative stress and caspase-3 activity, and an increase in GSH levels and SOD activity. WECF also inhibited the expression of NF- κ B protein and the MAPK signaling pathway, while upregulated heme oxygenase-1 (HO-1) via the Nrf2-mediated pathway. In addition, betainin, kaempferol, quercetin and rutin, presented in

WECF, at 1-10 μM inhibited ROS generation and TBARS formation, and significantly restored GSH levels, increased SOD activity, and both kaempferol and quercetin at 10 μM significantly increased Nrf2 protein expression in the cell nucleus in blue light-induced AREP-19 cells, compared to the cells treated with blue light alone. Taken together, WECF and its bioactive compounds against blue light-induced retina damage, which could potentially be useful for treating retinal disease.

In the second year of the study, an animal model was used as an experimental platform. The study aimed to investigate the effects of WECF, quercetin (Q) and betanin (B) on LED light-induced retinal damage in mice. The experimental design consisted of two models. In the first model, mice were initially exposed to LED light and subsequently administered the test substances. There were significant differences in superoxide dismutase (SOD) activity between the negative control group (NC) and mice treated with 10 mg/kg bw quercetin, 1.0 mg/kg bw betanin, 10 mg/kg bw betanin, and different concentrations (10, 50, 100 mg/kg bw) of WECF. However, no significant differences in TBARS in the eyeball, glutathione (GSH) content, or pathological changes in the inner nuclear layer (INL), outer nuclear layer (ONL), and inner and outer segments (IS&OS) thickness of the retina were found.

Additionally, in model 2, where mice were first administered the test substances and then exposed to LED light, WECF (100 mg/kg bw) demonstrated superiority over NC in terms of antioxidant indices and pathological tissue changes, including ONL and IS&OS thickness. Quercetin excelled over NC in terms of GSH levels, inhibition of lipid oxidation, and IS&OS indices. Furthermore, low-concentration betanin outperformed NC in the IS&OS indices. Moreover, the administration of 300 mg/kg bw WECF significantly improved visual acuity (VA) and visual contrast sensitivity (VCS) compared to the negative control. Evaluation results from electroretinography (ERG) also indicated that the 300 mg/kg bw WECF had a protective effect on the retina. These findings suggest that pre-administration of WECF in mice demonstrated preventive effects against LED light-induced retinal damage.

Overall, WECF and its bioactive components have been shown to protect retinal cells from blue light-induced damage. These findings are of significant reference value for the prevention of retinal diseases.

Keywords: djulis (*Chenopodium formosanum*); betanin; kaempferol; quercetin; rutin; light-emitting diode (LED); blue light irradiation; retinal pigment epithelium (RPE) cells; nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B); mitogen-activated protein kinases (MAPK); nuclear factor erythroid-derived 2-related factor (Nrf2); heme oxygenase-1 (HO-1); anti-photo-oxidative damage

參、前言

根據 2020 年世界衛生組織(World Health Organization, WHO)統計，全球至少有 22 億人口有某種形式的視力損害，而在高收入國家，黃斑部病變、青光眼、糖尿病視網膜病變則更為常見。推測其因與近年來生活方式之改變有關，其中，缺乏戶外運動及長時間接觸電子螢幕時間過長有關。另外，根據衛福部統計處資料顯示，2019 年領有政府視障手冊者計有 56,209 人(衛福部，2020)，惟實際視障人口約為數倍以上；而愛盲基金會 2016 年統計，全臺灣視能困擾者高達約 130 萬人(李等，2016)。尤其近年來 3C 產品充斥、螢幕鮮豔、亮度過高、使用時間等因素導致視力退化，而發光二極體 (light emitting diode, LED)光源對視力產生負

面影響的議題也頗受關切。再者，我國是近視人口較高的國家之一，且國人使用智慧型手機上網時數也是全球之冠(李等，2016)，因此衍生國人視力異常也正逐年增加。爰此，預防眼睛疾病乃為當務之急。另一方面，產官學研針對上述問題也積極尋求有效方法，以期降低國人視力異常衍生之疾病，其中藉由發掘天然活性物質藉以保護眼睛，是近年來研究重點之一。

紅藜(*Chenopodium formosanum*)為藜屬植物，排灣族稱為 djulis，為台灣原住民特有的重要傳統糧食作物，因具有綠色或紫紅色條紋而有「紅藜」、「赤藜」、「紫藜」、「彩虹米」等別稱。由於紅藜的營養價值高，近年來頗受國人青睞，而美國國家航空暨太空總署(NASA)更視其為有潛力的新作物(蔡，2006)。敝人多次獲科技部通過探討紅藜之功能性之研究計畫，且研發成果已發表於國際期刊，分別證實紅藜的 *in vitro* 與 *in vivo* 試驗有抑制細胞氧化壓力(Chyau et al., 2015)、護肝效應(Chu et al., 2016; Chen et al., 2018)、降血壓 (Chen et al., 2019)、降低脂肪細胞形成(Chyau et al., 2018)與抑制肝癌細胞與促凋亡性(Chu et al., 2020)，另對 PM2.5 誘發肺部細胞 A549 之傷害也具有保護效應(Chu et al., 2022)；彼等成果已為學界與業界引用與參考。此外，Hong 等(2016)指出，紅藜與其所含 rutin 及 chlorogenic acid 對紫外光誘發皮膚細胞之破壞性有保護性。由此可知，紅藜確實含有極佳之機能性，惟紅藜是否具有護眼效應之研究及其相關文獻則付之闕如。再者，敝人由先前研究計畫，以 HPLC-DAD 與 HPLC-MS/MS 分析得知紅藜水萃取物中含有 14 種化合物，經鑑定後計有 13 種為已知成分(Chu et al., 2022)，其中有 quercetin derivative 或配醣體、kaempferol 配醣體與 rutin 等六種酚類化合物，另外，也含有賦予紅藜紅色色素的 betanin、isobetanin、amaranthin、isodopaxanthin 等成分(Escribano et al., 2017)，以及 phenylacetic acid(苯乙酸)衍生物與 20-羥基甾皮酮(20-hydroxyecdysone)。此外，敝人先前試驗中發現，rutin、quercetin、kaempferol、betanin 在紅藜的抑制氧化壓力(Chyau et al., 2015)、護肝效應(Chu et al., 2016; Chen et al., 2018)、降血壓 (Chen et al., 2019)、降低脂肪細胞形成(Chyau et al., 2018)與抑制肝癌細胞生長與促肝癌細胞凋亡特性(Chu et al., 2020)，以及對 PM2.5 誘發肺部細胞 A549 之傷害具有保護效應(Chu et al., 2022)上扮演重要生物活性角色；雖然，敝人由紅藜已分析結果中看不出有葉黃素(lutein)或玉米黃質(zeaxanthin)之存在，惟紅藜含多量的 rutin、quercetin、kaempferol 配醣體、betanin 及其他活性成分(Chu et al., 2022)，尤其前人研究已提出，quercetin 可降低氧化壓力所致 ARPE-19 細胞氧化破壞，另亦可透過降低細胞凋亡路徑而有益於預防老年性黃斑部之病變(Bungau et al., 2019)。除此之外，其他生物活性成分是否亦具有保護視網膜細胞免於被光照破壞，目前仍甚為闕如。有鑑於此，在本研究中除以紅藜水萃取物為樣品，另以 rutin、quercetin、kaempferol、betanin 等為其代表性成分而做為試驗物質，並執行為期二年「紅藜與其活性成分對 LED 光源誘發視網膜傷害之保護效應」之計畫；由於藍光(blue light, BL) 是高能量的可見光，其波長範圍在 400-500 nm，而在 LED 中因其發光技術原理之所需，故其藍光量比螢光燈或白熾燈相對要高，隨之而來爭議性也較多，基於此，第一年研究計畫以藍光的 LED 為光源，探討紅藜及其代表性活性成分對 BL 光源誘發視網膜色素上皮細胞光氧化破壞之保護效應，並評估對 nuclear factor kappa-B (NF- κ B)與 mitogen-activated protein kinases (MAPK)訊息路徑與對 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)的調控及其下游抗氧化酵素之表現等機轉。第二年則利用動物模式，以 LED 光源誘發小鼠視網膜傷害之影響，探討紅藜及其代表性活性成分之甜菜鹼與槲皮素對小鼠視網膜之保護效應，除測定重要之生化指標，其病理切片將一併檢測。本為期二年計畫之研發成果將能有系統解析紅藜與其活性成分對 LED 光源誘發視網膜之保護效應，此成果不僅可應用於保健食品及醫藥界之

參考，更能彰顯紅藜附加價值，對國人健康之維護也極具有意義性。

肆、研究方法

第一年實驗方法

材料與方法

一、材料與藥品

本計畫所使用紅藜擬購自屏東可樂果公司。甜菜鹼(betainin)、山奈酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)、芸香苷(rutin)及其他試藥為一級藥品。ARPE-19 細胞株購自食品工業發展研究所生物資源保存暨應用中心。LED 燈 (L:300 mm x W:23 mm x H:33 mm, 5W, T5 LED 支架燈)購自築光坊。

二、試驗方法

(一)紅藜水萃取物之製備

紅藜以高速粉碎機(榮聰精密科技有限公司)研磨成粉末，以 1:10 比例加水煮沸萃取 20 分鐘，過濾後，濾液再以 1:10 比例加水煮沸 20 分鐘，二次之濾液進行減壓濃縮及冷凍乾燥，秤重後儲存於 4°C 備用，此為紅藜水萃取物(water extract of djulis, WECF)。

(二)藍光照射

使用波峰值 452 nm，強度為 1680 勒克斯的藍光發光二極體(LED)(T5CLED1-BLUE 8W, ZoomLighting)進行光照。以 LX-103 光照計(Lutron)進行光強度測定，每個培養皿底部距離 LED 為 50 mm。試驗照射過程中保持在室溫下。

(三)細胞培養

由液態氮筒取出 ARPE-19 細胞株迅速放置 37°C 水浴中回溫，將細胞種入 100-mm petri dishes 培養皿中，加入適量的培養基(90% 1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12 medium containing 1.2 g/L sodium bicarbonate, 2.5 mM L-glutamine, 15 mM HEPES and 0.5 mM sodium pyruvate + 10% fetal bovine serum.)，並於 37°C，5% CO₂ incubator 培養，每兩天更換一次培養液。

(四)細胞存活試驗法 (MTT)

以 MTT 測定法測定細胞的存活率。將細胞以 2×10^4 細胞/孔的密度接種於 96 孔板中，培養 24 小時。將細胞放置距離 LED 50 mm 處，使用藍光照射 6 小時，添加 0.1-25 $\mu\text{g/mL}$ 的 WECF 和 1-10 μM 的活性成分到培養基中，以 37°C 培養 18 小時。而後，在每孔中加入 50 μl 0.1% MTT，並在 37°C 培養 2 小時，去除培養基，加入 100 μl 二甲基亞砷 (DMSO)溶液，以 ELISA (Molecular Devices VMax, Visalia, CA, USA) 測定 540 nm 之吸光值(Chyau et al., 2015)。

(五)細胞內活性氧自由基的測定

以 DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) DCFH-DA 檢測細胞內的活性氧自由基(ROS)。將 ARPE-19 細胞以 4×10^5 細胞/孔的密度接種於在 6 孔板中，培養 24 小時。將培養皿距離 LED 50 mm 處，以藍光照射細胞 0.5 小時後，添加 0.1-25 $\mu\text{g/mL}$ 的 WECF 或 1、5、10 μM 的生物活性成分於培養皿，加入 50 μM 的 DCFH-

DA 反應 1 小時後，再以 Bio-Tek FLx 800 microplate fluorescence reader 測量螢光強度(excitation wavelength: 485 nm; emission wavelength: 528 nm)(Wang & Joseph, 1999)。

(六)細胞內脂質過氧化產物測定

丙二醛(malondialdehyde, MDA)是脂質過氧化的最終產物。MDA 的測量乃以硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)反應生成巴比妥酸反應性物質(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)通過螢光檢測而測定。將 ARPE-19 細胞以 4×10^5 細胞/孔的密度接種於在 6 孔板中，培養 24 小時。將培養皿距離 LED 50 mm 處，以藍光照射細胞 4 小時後，添加 0.1-25 $\mu\text{g/mL}$ 的 WECF 或 1、5、10 μM 的生物活性成分於培養皿，並在 37°C 下培養 1 小時後，收集細胞並破碎，取得上清液，再與三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)和 TBA 混合，放入沸水中煮沸 10 分鐘，而後添加 1 mM 的 β 羥基酸(beta-hydroxy acid, BHA)，使用 Bio-Tek FLx 800 microplate fluorescence reader 測量螢光強度(excitation wavelength : 530 nm ; emission wavelength : 590 nm)(Chirico et al., 1993)。

(七)細胞穀胱甘肽(glutathione, GSH)的測定

將 ARPE-19 細胞以 4×10^5 細胞/孔的密度接種於在 6 孔板中，培養 24 小時。將培養皿距離 LED 50 mm 處，以藍光照射細胞 4 小時後，添加 0.1-25 $\mu\text{g/mL}$ 的 WECF 或 1、5、10 μM 的生物活性成分於培養皿，並在 37°C 下培養 1 小時。而後以 PBS 洗滌細胞，以 5 μM 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMF-DA)反應 30 分鐘。再次用 PBS 洗滌細胞，使用 Bio-Tek FLx 800 microplate fluorescence reader 測量螢光強度(excitation wavelength : 485 nm ; emission wavelength : 528 nm) (Wu et al., 2005)。

(八)超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性測定

使用市售 SOD assay kit 測定 SOD 活性，測定方法簡述如下。將 ARPE-19 細胞以 5×10^5 細胞/孔的密度接種於在 6 孔板中，培養 24 小時。將培養皿距離 LED 50 mm 處，以藍光照射細胞 0.5 小時後，添加 0.1-25 $\mu\text{g/mL}$ 的 WECF 或 1、5、10 μM 的生物活性成分於培養皿，並在 37°C 下培養 4 小時後，收集細胞並破碎，取得細胞液，再和 SOD 反應試劑充分混合，而後在 37°C 培養 20 分鐘，使用 microplate spectrophotometer (Thermo Multiskan GO, Waltham, MA, USA)在 450 nm 處測量吸光度。

(九)粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential, MMP) 測定

將 ARPE-19 細胞以 5×10^5 細胞/孔的密度接種於在 6 孔板中，培養 24 小時。將培養皿距離 LED 50 mm 處，以藍光照射細胞 3 小時後，添加 0.1-25 $\mu\text{g/mL}$ 的 WECF 或 1、5、10 μM 的生物活性成分於培養皿，並在 37°C 下培養 15 分鐘而後，加入 10 μM 之 JC-1，並在含 5% CO₂、37°C 培養箱中下培養 30 分鐘。收集細胞，用 200 μL PBS 洗滌，再進行離心(75.53 g, 4 °C, 5 分鐘)。將細胞懸浮於 100 μL PBS 中，以 Bio-Tek FLx 800 microplate fluorescence reader 測量螢光強度(excitation wavelength : 530 nm ; emission wavelength : 590 nm)。

(十) Caspase-3 活性測定

將 ARPE-19 細胞以 3×10^6 細胞/孔的密度接種於在 6 孔板中，培養 24 小時。將培養皿距離 LED 50 mm 處，以藍光照射細胞 4 小時後，添加 0.1-25 $\mu\text{g/mL}$ 的 WECF

或 1、5、10 μM 的生物活性成分於培養皿，並在 37°C 下培養 2 小時。而後，以冷 PBS 洗滌細胞，加入 1 mL 胰蛋白酶-EDTA 處理 3 分鐘，離心後懸浮於 PBS 中，將細胞裂解物沉澱，而將上清液轉移至微量離心管中。每一離心管中加入 50 μL 含有 5 mmol/L DTT 和 5 μL 1 mmol/L DEVD-p-nitroanilide (pNA)-conjugated CPP32 反應緩衝液，而後在 37°C 水浴中培養 1 小時。以 ELISA (Molecular Devices VMax, MA, USA)，波長 405 nm 測定樣品的吸光度(Chyau et al., 2015)。

(十一) DAPI 染色試驗

將 ARPE-19 細胞以 5×10^5 細胞/孔的密度接種於在 6 孔板中，培養 24 小時。將培養皿距離 LED 50 mm 處，以藍光照射細胞 4 小時後，添加 0.1-25 $\mu\text{g/mL}$ 的 WECF 或 1、5、10 μM 的生物活性成分於培養皿。而後，以 PBS 洗滌細胞，並以 4% paraformaldehyde in PBS 固定 30 分鐘。固定後的細胞以 PBS 洗滌，以 4',6'-diamidino-2-phenylindole, DAPI 染色。使用螢光顯微鏡進行偵測，激發波長為 350 nm，檢測波長為 461 nm(Duh et al., 2012)。

(十二) Western Blot 分析

將 ARPE-19 細胞以 2×10^6 細胞/孔的密度接種於在 10 cm 培養皿中，培養 24 小時。將培養皿距離 LED 50 mm 處，對 NF- κB 、MAPKs (ERK、JNK 和 p38)、Nrf2 和 HO-1 的表達情況而言，分別以藍光照射時間為 6、0.5、2 和 3 小時後，添加 0.1-25 $\mu\text{g/mL}$ 的 WECF 或 1、5、10 μM 的生物活性成分於培養皿。在 37°C 下分別培養 15、2、14 和 16 小時，以 PBS 沖洗細胞，再以 lysis buffer 處理細胞，以 $10,000 \times g$ 、4°C 離心 10 分鐘。收集上清液，使用 BCA 蛋白定量試劑(Pierce, Pockfold, IL, USA)測定蛋白含量。每一樣品含 50 μg 蛋白，在 8%或 12%的 SDS-PAGE 凝膠上分離。電泳結束後，將凝膠移到硝酸纖維膜上。用 PBST (0.1% Tween-20 在 PBS 中，pH 7.4)洗滌後，在 5%牛血清蛋白溶液中培養 30 分鐘，而後以 rabbit monoclonal anti-NF- κB antibody (#8242) (1:1000) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、rabbit anti-JNK (AF6318) (1:1000), rabbit anti-pJNK (AF3319) (1:1000), rabbit pp38 (AF4001) (1:1000), rabbit anti-p38 (AF6456) (1:1000), rabbit anti-ERK (AF0155) (1:1000), rabbit pERK (AF1015) (1:1000), anti-Nrf2 (AF0639) (1:1000), anti-HO-1 (DF6391) (1:1000), anti-Lamin B1 (AF5161) (1:1000) (Affinity Biosciences, Cincinnati, OH, USA), and β -actin antibody (#4970) (1:1000) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)於在 4°C反應過夜。之後此 blot 和兔 IgG 抗體(Sigma, St. Louis, MO, USA)標記 horseradish peroxidase (HRP)培養反應。以 Western Bright Enhanced Chemiluminescence (ECL) plus 試劑(Advansta Inc., Menlo Park, CA, USA)進行顯影，並在 Gel Electrophoresis Documentation-Multifunction Gel Image 系統(Topbio Co., Taiwan, ROC)下進行。本測定使用 Image J 軟體，並根據 β -actin 及 Lamin B1 的參考帶計算蛋白質的相對表達量(Chyau et al., 2018)。

(十三) 統計分析

各項數據以統計分析系統統計套裝軟體(version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). 進行統計的變異數分析(ANOVA)，並以 Duncan's 多變異法(Multiple range test)探討各樣品之間的差異性。

第二年實驗方法

一、材料與藥品

本計畫所使用紅藜擬購自屏東可樂果公司。quercetin、betanin 及其他所使用試為一級藥品。實驗動物則購自樂斯科生物科技股份有限公司。LED 燈(L:300 mm x W:23 mm x H: 33 mm, 5W, T5 LED 支架燈)購自築光坊。

二、試驗方法

(一)樣品製備

紅藜水萃取物之製備

紅藜以高速粉碎機(榮聰精密科技有限公司)研磨成粉末，以 1：10 比例加水煮沸萃取 20 分鐘，過濾後，濾液再以 1：10 比例加水煮沸 20 分鐘，二次之濾液進行減壓濃縮及冷凍乾燥，秤重後儲存於 4℃ 備用，此為紅藜水萃取物(water extract of djulis, WECF)。

(二)動物試驗與分組

本計畫動物實驗已由嘉南藥理大學動物實驗管理小組審核通過。所使用的動物為 6 週齡，ICR 品系母鼠。實驗動物飼養於 PE 籠中，每一籠 4 隻小鼠，動物房維持在恆溫(室溫為 24±2℃)、相對濕度 55-60%之環境。飼養期間自由飲食，飼料與水均以自由給食方式，飼養或處理時避免動物驚嚇，且每次必須前後一致。動物飼料採用 LabDiet5001 標準飼料，餵養期間飼料及飲水均採自由進食，每兩天添加飼料以及紀錄實驗小鼠體重。試驗開始前先排除攝取量與成長率明顯偏低的動物。實驗小鼠經 1 週環境適應期後，將 72 隻小鼠以類拉丁方格方式，依照體重高低均勻分成 8 隻，動物分組如：

Control (C)；正常對照組

Negative control (NC): LED 光照損傷組

Quercetin 低劑量組(QL)：LED+低劑量 1.0 mg/kg bw quercetin

Quercetin 高劑量組(QH)：LED+高劑量 10 mg/kg bw quercetin

Betanin 低劑量組(BL)：LED+低劑量 1.0 mg/kg bw betanin

Betanine 高劑量組(BH)：LED+高劑量 10 mg/kg bw betanin

WECF 低劑量組(WL)：LED+低劑量 10 mg/kg bw WECF

WECF 中劑量組(WM)：LED+中劑量 50 mg/kg bw WECF

WECF 高劑量組(WH)：LED+管餵高劑量 100 mg/kg bw WECF

(三)動物試驗模式

本動物試驗分二種試驗模式平台，分別為：

1. LED 光源先誘發，再餵予待測物模式

以 LED 架設於飼養籠內，參考陳(2016)方法，以數位光照度計分別測量四個角落與中央區之測量點，每一測量點的照度落在 600-1000 lux，波長為 452 nm LED 照射，並據此調整 LED 光照方向與距離。以 12 小時亮/12 小時暗之週期先以 LED 光源照射 10 天。第 11 天起不進行白光 LED 燈照射，惟每天兩次分別管餵相對劑量的試驗待測物，管餵為期 20 天。第 31 天以 CO₂ 將實驗小鼠安樂死，從心臟採集血液進行生化分析，摘取實驗小鼠雙眼，進行組織切片及生化分析之檢驗。

2. 先管餵待測物，再以 LED 光源誘發模式

誘發方式參考陳(2016)方法，以數位光照度計分別測量四個角落與中央區之測量點，每一測量點的照度落在 600-1000 lux，並據此調整 LED 光照方向與距離。實驗進行之初，實驗組(WL、WM、WH、QL、QH、BL、BH)之小鼠每天兩次分別

管餵待測物，管餵時程計 20 天，當管餵進行到第 11 天時，負控制組(NC)以及實驗組(WL、WM、WH、QL、QH、BL、BH)之小鼠以 LED 光源誘發照射，燈光照射為 12 小時光暗循環，照射為期 10 天，A 組為正常對照組，光源誘發期間持續管餵待測物；試驗為期 20 天結束，第 21 天以 CO₂ 將實驗小鼠安樂死，從心臟採集血液進行生化分析，摘取實驗小鼠雙眼，進行組織切片及生化分析之檢驗。

3. 視覺機能評估模式

誘發方式參考陳(2016)方法，以數位光照度計分別測量四個角落與中央區之測量點，每一測量點的照度落在 600-1000 lux，並據此調整 LED 光照方向與距離。實驗進行之初，實驗組之小鼠先行每天兩次分別管餵紅藜水萃取物 300 mg/kg bw，管餵時程計 7 天，而後以 LED 光源誘發照射，燈光照射為 12 小時光暗循環，照射為期 10 天。照射試驗結束後分別進行視覺敏銳度(visual acuity, VA)、與視覺對比敏感度(visual contrast sensitivity, VCS)與視網膜電流圖儀(electroretinogram, ERG)等評估。

(四) 血清生化分析

1. 血清肝功能檢測

(1) 天門冬胺酸轉移酶(aspartate aminotransferase, AST)

檢測血清中 AST 活性的目的為常用來評估肝臟功能、心臟功能、及肌肉方面的參考依據。AST 採用 Human 之 Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1) 試劑。利用酵素法及比色原理測量在 340 nm 吸光值減少速率，即可求得 AST 活性。

(2) 丙胺酸轉胺酶(alanine aminotransferase, ALT)

檢測血清中 ALT 活性，作為肝臟發炎損害程度的參考依據。ALT 採用 Human 之 Alanine aminotransferase (EC 2.6.1.2) 試劑。利用酵素法及比色原理測量 340 nm 吸光值減少速率，即可求得 ALT 濃度。

2. 血清腎功能檢測

(1) 尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)

檢測血清中 BUN 濃度，為診斷腎臟代謝功能的參考依據。BUN 採用 Human 之 Urea Liquid 試劑。利用酵素法及比色原理測量血中 BUN 量，吸光值減少速率正比於尿素濃度，即可求得 BUN 濃度。

(2) 肌酸酐(creatinine, CRE)

檢測血清中 CRE 濃度，作為診斷腎臟代謝功能的參考依據。CRE 採用 Human 之 auto-Creatinine 試劑。吸光值增加速率與標準液增加速率相比，即可求得 CRE 濃度。

3. 氧化與抗氧化指標測定

(1) 脂質過氧化測定

本實驗採用 TBARS Assay Kit (Item No.10009055) 檢測 TBARS 值含量，做為評估過氧化程度和脂質氧化壓力指標。脂質過氧化會產生最終產物 malondialdehyde (MDA)，MDA 與 TBA 試劑反應會生成 TBARS，以分光光度計測定 530nm 吸光值，並計算出樣品中 TBARS 濃度。

(2) 麩胱甘肽測定

以 Glutathione assay kit (Cayman chemical; item NO.703002)檢測 GSH 之含量，作為評估組織抗氧化功能的參考指標。GSH 與 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)反應產生 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)及 GS-TNB，而 GS-TNB 被 GSH reductase 還原產生 TNB，TNB 產生率與 GSH 濃度成正比。以分光光度計 405-414 nm 下檢測吸光值並計算出樣品中 GSH 的濃度。

(3)超氧歧化酶測定

以 SOD colorimetric assay kit (Fortress Diagnostics Ltd., Antrim, UK; Product code: BXC0531)檢測 SOD 之酵素活性，作為評估組織內抗氧化功能的參考指標。取 50 μ l 眼球均質液分析，加入 1.7 mL mixed substrate 混勻後加入 250 μ l xanthine oxidase，置於 37°C 下，30 秒，以分光光度計測定 505 nm 於 3 分鐘內吸光值平均變化並計算其樣品活性。

(五)視覺機能評估模式

1. 視覺敏銳度(visual acuity, VA)與視覺對比敏感度(visual contrast sensitivity, VCS)之評估

本研究以動物視動(optomotor)與視動反射(optokinetic reflex)原理進行視覺機能分析。小鼠在清醒、無麻醉且不受拘束的環境下，置放於台座上並與顯示屏幕保持固定距離，以對應不同寬度(cycle per degree, cpd)的光柵而在固定移動速度下測量並評估小鼠之頭眼部反射動作，藉由視覺誘發頭部反射行為觀察小鼠受到特定 cpd 寬度光柵視覺刺激，進而評估其視覺機能。本研究以黑白光柵視標進行視覺敏銳度(visual acuity, VA)與視覺對比敏感度(visual contrast sensitivity, VCS)之視覺功能評估。黑白光柵視標用來對應綜合視覺機能，表示整體視覺功能的表現藉由此功能測試評估紅藜水萃取物與活性成分對中波長對應錐狀細胞之保護效益 (陳，2016)。

2. 視網膜電流圖儀(electroretinogram, ERG)評估

ERG 是用來偵測不同神經元細胞在受到光刺激後所發出的電位訊號的檢查工具，測定前小鼠置於暗室一小時適應後，以麻醉藥腹腔注射，將記錄電極平貼於角膜，以針狀參考電極置於小鼠眼結膜上，並將電極連接至耳朵，再以 ERG 儀測定 a 波幅與 b 波幅(鄭，2012)。

a 波幅:視網膜刺激前之基線至最低之波股，意謂感光細胞之活性。

b 波幅:指 a 波谷誘發反應後到最高之波峰值，表示兩極細胞與神經節細胞之活性。視力恢復率: a 波幅(誘發前)/a 波幅(誘發後)；b 波幅(誘發前)/b 波幅(誘發後)。數值愈大，視力恢復愈佳(鄭，2012)。

(六)組織病理切片

透過 Hematoxylin-Eosin staining (H&E)染色，觀察視網膜中上皮層、外核層、內核層與桿細胞內節厚度、桿細胞外節長度等變化。本實驗摘取試實驗小鼠眼球，經由 Davidson's Fluid 固定、石蠟包埋、切片及水化後，以 H&E 染色方法判讀出視網膜中各層結構，並藉此觀察結構的變化。

(七)統計方法

本實驗各項數據以 Statistical Analysis System, SPSS 12.0 統計軟體進行 One-way ANOVA 變異數分析，再透過 Duncan's 多重比較法(Duncan's Multiple Range Test)與 Mann-Whitney U-test 比較各組之間的顯著差異性($p < 0.05$)。

伍、結果與討論

第一年結果與討論

第一年研究計畫以波長範圍在 400-500 nm 高能量的藍光為光源，並進行兩種模式探討，分別為：

1. 以待測樣品(WECF)與細胞先預處理，再以 BL 光源誘發模式。
2. 先以 LED 之 BL 光源誘發細胞，再添加 WECF 與細胞共培養。

以上述兩種模式分別探討 WECF 對 LED 之 BL 光源誘發視網膜色素上皮細胞光氧化傷害之影響，並解析對 NF- κ B 與 MAPK 訊息路徑與對 Nrf2 的調控及其下游抗氧化酵素之表現等機轉。

圖一為紅藜水萃取物(WECF)與 ARPE-19 細胞反應 24 小時對細胞生存性。結果顯示不同濃度 WECF(0.1-25 μ g/mL)對 AREP-19 細胞之存活率約可達 100%以上(圖一)，顯示不同濃度 WECF 對 AREP-19 細胞生存性不具影響。由於 WECF 對 AREP-19 細胞生存性不具影響，因此，本研究以 0.1-25 μ g/mL 之 WECF 繼續如下之試驗。

圖二為 BL 對 ARPE-19 細胞照射不同時間後培養不同時間之細胞生存性。結果顯示 AREP-19 細胞經 BL 照射 6 小時後，再培養 12、18 或 24 小時，其中，以培養 18 與 24 小時所得結果對細胞傷害比較明顯，因此，以照射 6 小時與培養 18 小時作為後續試驗之時間點。

圖三為 WECF 與 ARPE-19 預先處理不同時間，再經 BL 照射 6 小時，而後培養 18 小時之細胞存活率。ARPE-19 細胞經 BL 照射 6 小時，其細胞生存性降至 62.0%，顯示 BL 照射對 ARPE-19 細胞有顯著傷害性。而不同濃度 WECF (0.1, 1, 10, 25 μ g/mL)與 ARPE-19 預處理 0.5, 1 與 2 小時，再經 BL 照射 6 小時後培養 18 小時，彼等細胞生存性與 BL 組幾乎相等。由此顯示 WECF 與 ARPE-19 預處理再經 BL 照射之模式對細胞生存並無保護作用。

圖四為 WECF 與經 BL 照射 6 小時後之 ARPE-19 細胞反應 18 小時，對其細胞生存性之影響。結果顯示 ARPE-19 細胞經 BL 照射 6 小時後，再培養 18 小時其生存率為 55.8%，顯示 BL 照射對 ARPE-19 細胞有顯著傷害性，惟經 0.1, 1, 10, 25 μ g/mL WECF 反應 18 小時，其細胞生存率分別為 60.1, 64.6, 70.1, 80.1%，顯示 WECF 對 BL 照射其細胞生存性有顯著增加，且具有濃度與效應之趨勢。綜合圖三與圖四結果而言，以 BL 光源先誘發細胞，再添加 WECF 與細胞共培養之模式對視網膜色素上皮細胞光氧化傷害具有保護效應。據此，以 BL 預先照射細胞再添加 WECF 模式賡續以下試驗。

圖五為 WECF 與經 BL 照射 0.5 小時之 ARPE-19 細胞反應 1 小時對其 ROS 生成之影響。顯示 BL 單獨處理 0.5 小時可使細胞內 ROS 產生之量為空白組之 1.72 倍，若以 0.1, 1, 10, 25 μ g/mL WECF 共培養 1 小時，則 ROS 產生為空白組之 1.32, 1.20, 1.15, 1.05 倍。很明顯，不同濃度 WECF 與 BL 單獨處理相比較，前者具有抑制 BL 誘發 ARPE-19 胞內 ROS 生成之能力。

圖六為 WECF 與經 BL 照射 4 小時之 ARPE-19 細胞反應 1 小時對其 TBARS 生成

之影響。結果顯示 BL 單獨作用 4 小時，ARPE-19 胞內之 TBARS 含量與空白組相較顯著增加 84.9%，顯示 BL 誘發 ARPE-19 胞內脂質氧化產物之產生。若再與 0.1, 1, 10, 25 $\mu\text{g/mL}$ WECF 共培養 1 小時，則胞內之 TBARS 含量與空白組相較為增加 35.1、33.0, 22.6, 1.90%，表示 WECF 具有降低 BL 誘發胞內脂質氧化產物之含量。

圖七為 WECF 與經 BL 照射 0.5 小時之 ARPE-19 細胞反應 1 小時對其 GSH 之影響。顯示 BL 單獨作用 0.5 小時，ARPE-19 胞內之 GSH 含量與空白組相較，減少至 69.2%，若再與 0.1, 1, 10, 25 $\mu\text{g/mL}$ WECF 共培養 1 小時，胞內之 GSH 含量與空白組相較，分別為 75.3, 78.8, 85.7、90.5%，顯示 WECF 減緩 BL 誘發 ARPE-19 胞內 GSH 含量下降趨勢。

此外，本研究測定 WECF 與 BL 照射 0.5 小時之 ARPE-19 細胞反應 4 小時對其 SOD 之影響。結果顯示，在 BL 照射下，與空白組($13.4 \pm 0.4 \text{ U/mg}$)相比較，ARPE-19 細胞內 SOD 活性顯著性降低($7.1 \pm 0.4 \text{ U/mg}$) (圖八)，而 WECF 處理的細胞其 SOD 活性呈現劑量與活性增加相關性趨勢。以 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 WECF 而言，其 SOD 活性為 $15.0 \pm 0.9 \text{ U/mg}$ ，很明顯高於 BL 照射組，且與空白組無顯著性差異($p > 0.05$)。

圖九為 WECF 與經 BL 照射 3 小時之 ARPE-19 細胞反應 15 分鐘對其粒線體膜電位(MMP)之影響。BL 單獨作用 3 小時，ARPE-19 胞內之 MMP 與空白組相較，減少至 35.6%，若再與 0.1, 1, 10, 25 $\mu\text{g/mL}$ WECF 共培養 15 分鐘，胞內之 MMP 與空白組相較，分別為 40.1, 39.9, 58.9、63.9%，此結果顯示 WECF 抑制 BL 誘發 ARPE-19 胞內 MMP 下降趨勢。

圖十為 WECF 與經 BL 照射 4 小時之 ARPE-19 細胞反應 2 小時對 Caspase-3 之影響。由此可知，BL 可使胞內之 Caspase-3 活性增加，顯示 BL 對 AREP-19 細胞有促凋亡現象。若與 0.1, 1, 10, 25 $\mu\text{g/mL}$ WECF 共培養 2 小時，胞內之 Caspase-3 與 BL 單獨處理組(100%)相較，分別為 92.0, 76.5, 67.5、43.7%。顯示 WECF 有抑制 BL 誘發 Caspase-3 活性之效應。換言之，WECF 可抑制 BL 誘發 AREP-19 細胞凋亡特性。

圖十一為以 DAPI 染色法探討 WECF 與 BL 照射 4 小時之 ARPE-19 細胞反應 2 小時其細胞核形態學變化之影響。結果顯示，正常細胞(空白組)呈現圓形，其染色質皆均勻分散，並具有完整的細胞膜。然而，暴露於 BL 4 小時的細胞呈現細胞核收縮和碎裂，顯示細胞有凋亡現象。然而，不同濃度 WECF 處理的細胞其染色質和細胞核內 DNA 環的碎裂程度較為減少，顯示 WECF 具有抗凋亡特性，且其抗凋亡作用與其劑量增加有相關性。

NF- κ B 是一種轉錄因子，可調節先天免疫並對整體粒線體功能有其貢獻度。本研究測定 WECF 對藍光誘導的 ARPE-19 細胞中 NF- κ B 的影響。如圖十二所示，BL 照射情況下，與空白組相比，BL 組在細胞核的 NF- κ B 含量增加為 4.02 倍，然而，25 $\mu\text{g/mL}$ 的 WECF 組則增加為 1.20 倍，很顯然，WECF 抑制 NF- κ B 的轉位，降低藍光誘導的 ARPE-19 細胞中 NF- κ B 的核轉錄量。前人研究顯示，誘發或抑制 NF- κ B 信號傳導會依不同的氧化壓力試驗模式而定。此外，在氧化壓力環境中，NF- κ B 路徑可同時具有抗氧化和促氧化作用(Lingappan, 2018)。本試驗顯示，BL

誘導 ROS 生成，促進 NF- κ B 的磷酸化，隨後引發 NF- κ B 轉位，進而導致 ARPE-19 細胞損傷(Kuse et al., 2014)。在本研究中，WECF 抑制 BL 誘導 ROS 生成、NF- κ B 磷酸化以及 NF- κ B 的核轉位。因此，推測 WECF 藉由抑制 NF- κ B 信息路徑，從而降低 BL 誘導 ARPE-19 細胞光氧化損傷。

為進一步說明 WECF 對抑制 BL 誘發 AREP-19 細胞產生光氧化破壞現象之訊息調控，本研究測定 MAPK 訊息途徑關鍵蛋白之表達。由圖十三結果可知，BL 誘發 AREP-19 細胞 p-p38/p38、p-ERK/ERK 與 p-JNK/JNK 相對比率，顯示 BL 誘發細胞產生光氧化破壞可能與其涉及 p38、ERK 與 JNK 之 MAPK 路徑有關連性。另一方面，細胞經 WECF 共培養後可顯著抑制 BL 誘發 AREP-19 細胞 MAPK 蛋白磷酸化作用。綜合上述結果揭示，BL 照射導致 AREP-19 細胞產生光氧化壓力(photo-oxidative stress) (圖五)，進而活化 MAPK 路徑(pathway) (圖十三)。前人研究顯示，一旦 MAPK 的 ERK、p38、JNK 等蛋白被磷酸化，將進一步產生細胞凋亡(圖十與十一) (Taylor et al., 2013)。由圖十三結果可揭示，WECF 抑制 BL 誘發 AREP-19 細胞 MAPK 路徑，進而有保護 AREP-19 細胞免於被光氧化破壞，此結果可能原因與其藉由抑制 MAPK 的磷酸化，從而阻斷 MAPK 信息路徑有關連性。

過去研究已顯示，氧化壓力會增加 Nrf2 蛋白的表達，而由本研究已知 BL 照射會誘導 ROS 生成(圖五)，因此有必要進一步探討 BL 誘導的光氧化是否也會激活 Nrf2 途徑，以及 WECF 處理是否會影響 BL 誘導細胞中 Nrf2 蛋白的表達。圖十四為 WECF 在 BL 照射對 ARPE-19 細胞之 Nrf2 蛋白表達的影響。本研究分析 Nrf2 蛋白在細胞質和細胞核的表達情況。結果顯示，在 BL 照射情況下，WECF 組在細胞質的 Nrf2 蛋白表達低於 BL 組，而在細胞核中的 Nrf2 蛋白表達反而較 BL 組多，由此顯示，WECF 有促進 Nrf2 蛋白在細胞核內之表達。許多研究報告指出，Nrf2 可與抗氧化反應元件(antioxidant response elements, ARE)結合，進而誘發下游抗氧化系統之表現，其中包括編碼抗氧化酶(encoding of antioxidant enzymes)之活性表現(Xiong et al., 2022)。此外，當細胞受到氧化壓力攻擊時，Nrf2 可能轉移到細胞核並激活這些抗氧化酶的轉錄，這可由圖十四可看出；BL 組在細胞核內之表達相對性地大於空白組。再由圖十四顯示，WECF 處理後經 BL 照射之細胞其 Nrf2 蛋白在細胞質和細胞核中表達有顯著性的差異，此說明 WECF 誘發 Nrf2 轉移到細胞核中(Xiong et al., 2022)，此結果表明，WECF 可增強 Nrf2 蛋白在細胞核表達，從而有助於下游抗氧化酵素之表達，進而強化 ARPE-19 細胞抗氧化與降低胞內氧化壓力之產生。

圖十五為 WECF 在與經 BL 照射對 ARPE-19 細胞血紅素氧化酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)表達的影響，由結果顯示，在 BL 照射情況下，WECF 組之 HO-1 表達分別高於 BL 照射組與空白組。此結果證實在 BL 誘導的 ARPE-19 細胞中，WECF 可誘發 HO-1 的表現。換言之，在 BL 存在下，WECF 能有效地增強 HO-1 之表達，且誘發 Nrf2/HO-1 信息路徑，進而誘發 BL 誘導的 ARPE-19 細胞中的抗氧化途徑(Wang et al., 2020; Suarez-Barrio et al., 2020)。因此，推測 WECF 可作為 Nrf2/ARE 信息路徑的激活劑，從而誘發細胞抗氧化路徑，藉此抑制 BL 對 ARPE-19 細胞光氧化破壞。

由上述結果可知，WECF 具有抑制光氧化破壞，而此活性是否與其所含生物活性成分有關，有待進一步了解。基於此，本研究廣續分析 WECF 所含生物活性成分與 WECF 抑制光氧化破壞之關聯性。在本研究中以 rutin、quercetin、kaempferol、

betanin 為試驗物質繼續以下試驗。

圖十六為四種成分包括 betanin, rutin, kaempferol 與 quercetin 與 ARPE-19 細胞反應 24 小時對細胞生存性之影響。結果顯示除 25 μ M quercetin 對細胞生存性(70.21%)有影響外，其餘三種成分在 1-25 μ M 對細胞生存性皆大於 80%，表示對 ARPE-19 細胞生存性不具影響。因此，本研究四種活性成分以 1-10 μ M 為試驗濃度。

圖十七為四種成分與經 BL 照射 6 小時之 ARPE-19 細胞反應 18 小時對細胞生存性之影響。結果顯示 ARPE-19 細胞經 BL 照射 6 小時後，再培養 18 小時其生存率為 59.1%，而以 10 μ M 之紅藜活性成分 betanin、rutin、kaempferol 與 quercetin 而言，細胞生存率分別為 67.1、93.3、107.1 與 86.9%。顯示四種成分有顯著性抑制 BL 降低 AREP-19 細胞生長現象。

圖十八為四種成分與 BL 照射 0.5 小時之 ARPE-19 細胞反應 1 小時對其 ROS 生成之影響。betanin、rutin、kaempferol 與 quercetin 與單獨處理 BL 控制組相比較，不同濃度 betanin、rutin、kaempferol 與 quercetin 皆可減少 BL 誘發 ARPE-19 細胞活性氧之生成量。另外，BL 單獨作用 4 小時，ARPE-19 細胞胞內之 TBARS 含量與空白組相較，顯著增加胞內脂質氧化產物之產生(圖十九)，惟細胞分別與 betanin、rutin、kaempferol 與 querceti 共培養 1 小時，則胞內之 TBARS 含量顯著降低，表示 betanin、rutin、kaempferol 與 quercetin 具有抑制 BL 誘發 AREP-19 胞內脂質氧化產物之產生。

圖二十為四種成分與經 BL 照射 0.5 小時之 ARPE-19 細胞反應 1 小時對其 GSH 之影響。顯示 BL 單獨作用 0.5 小時，ARPE-19 胞內之 GSH 含量與空白組相較，減少至 70.7%，若再與 betanin、rutin、kaempferol 與 quercetin 分別共培養 1 小時，胞內之 GSH 含量與 BL 組相較，則分別顯著性增加 GSH 含量，顯示 betanin、rutin、kaempferol 與 quercetind 可抑制 BL 誘發 ARPE-19 胞內 GSH 含量下降趨勢。

圖二十一為四種成分與經 BL 照射 0.5 小時之 ARPE-19 細胞反應 4 小時對其 SOD 之影響。顯示 BL 單獨照射 0.5 小時，ARPE-19 細胞內 SOD 活性與空白組(15.9 $\pm$ 0.3 U/mg)相比，顯著性降低(9.3 $\pm$ 0.7 U/mg)，而經四種成分處理的細胞其 SOD 活性呈現劑量與活性增加相關性趨勢。顯示 betanin、rutin、kaempferol 與 quercetind 可提升 BL 誘發 ARPE-19 胞內 SOD 含量上升趨勢。

圖二十二為四種成分與經 BL 照射 3 小時之 ARPE-19 細胞反應 15 分鐘對粒線體膜電位之影響。由結果可看出，三種濃度的 betanin、rutin 可抑制 BL 誘發 ARPE-19 胞內 MMP 下降趨勢，而 1 μ M 之 kaempferol 與 quercetin 亦有抑制作用，惟 5 與 10 μ M 之 kaempferol 與 quercetin 則無此效應，其原因有待進一步了解。

圖二十三為 betanin、rutin、kaempferol 與 quercetin 對 BL 誘發 ARPE-19 胞內 caspase-3 活性之影響，顯示四種成分有抑制 BL5 誘發 AREP-19 胞內 caspase-3 活性之效應，且呈現劑量與反應性之關係。

圖二十四顯示 betanin、rutin、kaempferol 與 quercetin 對 BL 誘發 ARPE-19 細胞內 Nrf2 蛋白表達的影響。在蛋白表達方面，本研究分析細胞質和細胞核中 Nrf2 蛋

白的表達。10 μ M 的 kaempferol and quercetin 對細胞核中 Nrf2 蛋白的表達較 BL 組要顯著性增加($p<0.05$)，雖然 10 μ M 的 betanin 與 rutin 增加細胞核中 Nrf2 的表達，惟與 BL 組並沒有顯著差異($p>0.05$)。

圖二十五為 betanin、rutin、kaempferol 與經 quercetin 對 BL 誘發 ARPE-19 細胞之血紅素氧化酶-1 (HO-1)表達的影響。BL 照射之 10 μ M betanin 組與 BL 照射組相比有顯著性增加($p<0.05$)，而 10 μ M 的 rutin、kaempferol 與 quercetin 有增加藍光誘導細胞中 HO-1 的表達，惟與 BL 照射組比較並沒有顯著差異($p>0.05$)。

由上述結果表明，WECF 具有保護 BL 誘導 ARPE-19 細胞的作用，可部分歸因於其具有抗氧化潛力之生物活性成分(如上述四種化合物)處理所致。此外，敝人先前的研究亦顯示，WECF 含有其他已識別成分與未經鑒定的化合物(Chu et al., 2022)。前人研究顯示，由於存在於植物中的植化素(phytochemicals)之間的協同作用(synergistic effects)是導致彼等具生物活性之主因，(Blasa et al., 2011)。因此，推測存在於 WECF 中之生物活性成分以及其他化合物之協同作用，有可能導致 WECF 具有抗光氧化作用之原因(Chyau et al., 2015)。

綜合上述，紅藜在 BL 誘發細胞光氧化試驗中表現出保護細胞效應，此效應與紅藜具有抑制 BL 誘發光氧化壓力、通過抑制 NF- κ B 和 MAPK 信號傳導、激活 Nrf2/HO-1 途徑，進而保護 ARPE-19 細胞免受 BL 誘導的光氧化損傷。此外，存在於紅藜內之 betanin、rutin、kaempferol 與 quercetin 因具有生物活性，因而賦予紅藜對視網膜細胞有一定程度之保護效應。

第二年結果與討論

由第一年研發成果可知 WECF 與四種活性成分具有抗光氧化作用。另外，考量 betanin 為賦予紅藜紅色成分，而 rutin 是一種配醣體，其在腸胃中會分解成 quercetin 與糖類。再者，因活性成分不易取得，因此在 *in vivo* 試驗以 betanin 與 quercetin 為代表物質，並與 WECF 共同作為試驗樣品。基於此，第二年試驗以小鼠為試驗動物，並介入待測物(WECF、quercetin、betanin)，評估彼等對 LED 誘發小鼠視網膜傷害之影響。實驗設計為分兩種模式進行，模式一為先以 LED 光源誘發小鼠視網膜，而後管餵待測物；模式二則為動物先行管餵待測物後，再以 LED 光源誘發小鼠。兩種模式小鼠皆以病理檢測觀察視網膜結構變化，及檢測血液生化值，評估待測物對肝、腎生化功能之影響，並評估視覺敏銳度(visual acuity, VA)、視覺對比敏感度(visual contrast sensitivity, VCS)，再以視網膜電流圖儀(ERG)測定動物視網膜細胞之反應。

模式一，LED 光源先誘發，再餵予待測物模式

1. 血清之肝與腎功能指標分析

表一為以 LED 先誘發小鼠，再餵予 WECF、quercetin 與 betanin，評估對小鼠血漿生化標記物的影響。AST 與 ALT，是肝細胞製造的兩種最多酵素；當肝臟發炎時，肝細胞會壞死，而 AST、ALT 即進入血液造成酵素活性指數升高，藉此作為肝臟發炎或受損程度的評估。表一顯示各試驗組、負控組(NC)及空白組(C)相比，皆無顯著差異($p>0.05$)，顯示 LED 對小鼠肝臟不會造成負擔或損傷，而餵予不同濃度紅 WECF 及 quercetin 與 betanin 之各組之小鼠肝臟亦未發現有負擔或損傷現象。另外，尿素氮(blood urea nitrogen, BUN) 是臨床上最常用的腎功能指標之一，濃度過高意味著腎臟無法順利將尿素氮排出體外，藉此可評估腎臟方面的疾

病；而肌酸酐(creatinine, Cre)是人體肌肉中肌酸的分解產物，屬於代謝廢物的一種，由腎臟將其排至尿液中。因此血液中所含的肌酸酐，都是從肌肉中以穩定速率代謝產生，是非常穩定的腎功能指標，常用於評估腎功能障礙的嚴重程度及腎臟病的病情監控。由表一顯示，各試驗組、負控組(NC)與空白組(C)相比皆無顯著差異，顯示 LED 光對小鼠腎臟不會造成損傷，而餵予不同濃度紅藜水萃取物及 quercetin 與 betanin 之各組之小鼠腎臟亦未發現有損傷現象。

2. 氧化與抗氧化指標測定

表二為以 LED 先誘發小鼠，再餵予 WECF 及其活性成分 quercetin 與 betanin 對小鼠眼球氧化和抗氧化分析。由結果顯示以 LED 先誘發小鼠各組之 TBARS 與 GSH 含量皆無顯著差異，而負控組(NC)之 SOD 活性顯著性低於對照組(C)，顯示 LED 會誘發降低小鼠 SOD 活性，惟 QH、NC、BH、WL、WM、WH 各組之 SOD 活性顯著高於負控組(NC)，其中，以 BH 與 WH 組之 SOD 活性增加程度最為顯著，雖然彼等二組與負控組(NC)組之 TBARS 含量無顯著差異($p>0.05$)，惟由於其抗氧化酶 SOD 活性增加，進而使得 BH 與 WH 組之 TBARS 含量下降最多有關連性。

3. 病理變化試驗，

將動物麻醉後，摘取眼部組織，通過一系列上升濃度乙醇脫水，並嵌入於石蠟中包埋，將其切片成 1-1.5 μm 的薄片，經染色後，以數位電腦影像聯結顯微鏡分析系統偵測分析內核層(inner nuclear layer, INL)、外核層(outer nuclear layer, ONL)、視網膜感光器內節與外節(inner and outer segments, IS&OS)等病理變化結果如下：圖二十六為以 LED 先誘發小鼠，再餵予 WECF、quercetin 與 betanin 對視網膜內核層(INL)厚度之影響。由結果顯示，各組對 LED 誘發小鼠視網膜內核層(INL)厚度並無顯著差異($p>0.05$)。

圖二十七為以 LED 先誘發小鼠，再餵予 WECF、quercetin 與 betanin 對視網膜外核層(ONL)厚度的影響。由結果顯示，負控組(NC)顯著低於對照組(C) ($p<0.05$)，此說明小鼠在 LED 誘發情形下，其視網膜外核層(ONL)厚度有下降現象，惟各試驗組之外核層(ONL)厚度與負控組(NC)之間無顯著差異($p>0.05$)。

圖二十八為以 LED 先誘發小鼠，再餵予 WECF、quercetin 與 betanin 對小鼠視網膜 IS&OS 厚度的影響。由結果顯示，各組對 LED 光誘發小鼠視網膜感光器 IS&OS 厚度並未有顯著差異($p>0.05$)。

綜合上述，以 LED 光源先誘發小鼠，再餵予待測物模式顯示，QH、LED、BH 與不同濃度之 WECF 在 SOD 活性表現比負控組(NC)有顯著差異，其餘在眼球之脂質氧化、麩胱甘肽與視網膜之 INL、ONL、IS&OS 等病理變化並無明顯差異。由此顯示，小鼠先行以 LED 誘發後，再餵予上述待測物並無法改善小鼠已受損之視網膜。

模式二，小鼠先管餵待測物後，再以 LED 光源誘發試驗模式

1. 血清之肝與腎功能指標分析

表三為先管餵 WECF、quercetin 與 betanin 後，再以 LED 誘發小鼠，評估對其血漿生化標記物的影響。顯示各試驗組、負控組(NC)及空白組(C)之 AST 與 ALT 數據相比皆無顯著差異($p>0.05$)，顯示 LED 光對小鼠肝臟不會造成負擔或損傷，且

餵予不同濃度 WECF 及 quercetin 與 betanin 之各組之小鼠肝臟亦未發現有負擔或損傷現象。另外，各試驗組及負控組(NC)與空白組(C)之 BUN 與 CRE 值相比，皆無顯著差異($p>0.05$)，顯示 LED 光對小鼠腎臟不會造成損傷，而餵予不同濃度 WECF 及 quercetin 與 betanin 之各組之小鼠腎臟亦未發現有損傷現象。由以上兩種試驗模式，均顯示 LED 照射對小鼠肝與腎不會有任何影響。

2. 氧化與抗氧化指標測定

表四為先管餵待測物後，再以 LED 先誘發小鼠對其眼球氧化和抗氧化標誌之分析。由結果顯示負控組(NC)之 TBARS 很明顯高於對照組(C)，而 QH、WM、WH 顯著性低於負控組(NC)($p<0.05$)；另外，負控組(NC)之 GSH 含量明顯低於空白組(C)($p<0.05$)，而 QH、WL、WH 各組之 GSH 含量明顯高於負控組(NC)($p<0.05$)。對 SOD 活性影響而言，負控組(NC)之 SOD 活性顯著性低於空白組(C)($p<0.05$)，表示 LED 會誘發降低小鼠 SOD 活性，惟 WL、WM、WH 各組之 SOD 活性顯著高於負控組(NC)($p<0.05$)，其中，WH 組之 SOD 活性增加程度最為顯著，這與 WH 組之 TBARS 含量下降最多，而 GSH 含量上升最為顯著有關連性。

3. 病理變化試驗，

本研究分析視網膜內核層(INL)、外核層(ONL)與視網膜感光器內節與外節(IS&OS)等病理變化結果如下：

圖二十九顯示先管餵待測物後，再以 LED 光源誘發試驗模式之各組對 LED 光誘發小鼠視網膜內核層(INL)厚度並未有顯著差異($p>0.05$)。

圖三十為本模式各試驗組對小鼠之視網膜外核層(ONL)厚度的影響，顯示負控組(NC)顯著低於對照組(C)($p<0.05$)，而 WH 組之外核層(ONL)顯著大於負控組(NC)($p<0.05$)，其餘各試驗組與負控組(NC)之間並無顯著差異($p>0.05$)。

圖三十一為本模式各試驗組對小鼠視網膜感光器內節與外節(IS&OS)厚度的影響。與對照組(C)比較，負控組(NC)顯著降低 IS&OS 厚度($p<0.05$)，而 QL、QH、BL 與 WH 與負控組(NC)相比較則有增加 IS&OS 厚度現象 ($p<0.05$)。由於 IS&OS 與 retinal pigment epithelium (RPE)厚度被認為是預測視網膜敏感性最重要特徵 (Muller et al., 2021)，而由圖三十一可知 QL、QH、BL 與 WH 可緩和因 LED 光源誘發而使 IS&OS 厚度減少趨勢。由結果顯示，QL、QH、BL 與 WH 對小鼠視網膜感光細胞具有一定程度保護徵象。

有鑑於先行餵予待測物，再施於 LED 照射模式，WECF 組在抗氧化與病理變化有優於負控組(NC)，因此賡續進行視覺敏銳度(visual acuity, VA)、視覺對比敏感度(visual contrast sensitivity, VCS)與視網膜電流圖儀(electroretinogram, ERG)等評估。再者，由預備試驗得知，上述 WECF 所用濃度效果不佳。另外，quercetin 與 betanin 在上述兩種濃度之效果不如 WECF，因此以 300 mg/kgbw 之 WECF 為測試濃度，賡續進行 VA，VCS 與 ERF 等試驗。

4. 視覺敏銳度(visual acuity, VA)

黑白光柵視覺敏銳度

由圖三十二的黑白光柵分析中，可看出實驗期10天小鼠視覺敏銳度閾值的比較。空白組(C)之VA為 0.42 ± 0.03 cpd，負控組(NC)之VA為 0.12 ± 0.04 cpd，且兩者間有顯著差異($p<0.01$)，而WECF組之VA為 0.26 ± 0.08 cpd與負控組(NC)相比

較，則彼此之間有顯著性差異($p<0.05$)。由此結果顯示，先行餵予300 mg/kg bw之WECF再行LED光誘發損傷，在為期10天試驗後，所測得的視覺敏銳度優於負控組，顯示餵予WECF的小鼠具有延緩與保護視覺機能退化之效果。

5. 視覺對比敏感度(visual contrast sensitivity, VCS)

黑白視覺對比敏感度(white visual contrast sensitivity, WVCS)

由圖三十三為小鼠於實驗期結束之黑白視覺對比敏感度之鐘形分布圖。圖中之 X 軸代表不同的光柵寬度(頻率)，以 cpd 為單位，而 Y 軸代表在特定光柵寬度下所能分辨的最小螢幕顯示明暗差異。以百分比表示，100%代表亮暗差異分明；0%代表亮暗無差異。由結果顯示，黑線代表的空白組涵蓋最大的可視範圍；粉紅線代表的 LED 負控組涵蓋的可視範圍最小；而藍色為餵予 WECF 組，其涵蓋範圍則介於兩者之間，且與負控組(NC)有顯著差異($p<0.05$)。由此顯示，餵予 WECF 組的鐘形分布曲線在整體趨勢上優於 LED 負控組。另外，在圖三十三中，將鐘形分布圖各組之可視區範圍數據量化分析後，換算空白組的 VCSF 可視區域為為 $45.84\pm 9.11\%$ 、LED 負控組為 $5.60\pm 1.87\%$ 而試驗組為 $17.18\pm 5.84\%$ 。顯示餵予 WECF 組顯著優於負控組，這說明紅藜水萃取物組具有保護視覺對比敏感度，進而減緩 LED 光損傷所造成的退化效果。

本研究進一步分析各光柵寬度(cpd)中的對比敏感閾值；分別以六種不同等級 cpd 光柵寬度為標準，呈現各組之小鼠於同樣 cpd 光柵寬度刺激下視覺對比敏感度的閾值；由結果顯示各光柵寬度中，空白組之 VCSF 皆優於負控組。對 WECF 組而言，在 0.082 cpd 與 0.164 cpd 兩種寬度光柵測驗下，餵予 WECF 組之視覺機能表現顯著優於負控組($p<0.05$)。在 0.328 cpd 寬度光柵測驗下，餵予 WECF 組可測得視覺機能表現，而負控組無法測得視覺機能表現。由本試驗結果顯示，先餵予紅藜水萃取物的小鼠，再以 LED 光誘導其視網膜損傷模式下，能有效保護功能性視覺(functional vision)避免對比敏感度(VCSF)表現衰退。

6. 視網膜電流圖儀(Electroretinogram, ERG)評估

ERG 是光線刺激視網膜後所產生電流反應的記錄。藉由計算視網膜電圖中 a 波與 b 波的振幅(amplitude)與絕對時間(implicit time)之關係，解此可用來評估視網膜的功能(許，2007)。此外，在人的眼球內，除了目前已知視錐細胞(cone cell)與視桿細胞(rod cell)外，感光細胞(photoreceptor cell)是另一種具有高度光敏感的視網膜神經節細胞，它具有感受光亮以及區分白晝與夜晚之功能，並將訊息傳達至大腦 (Forbese, 2023)。再者，因人體視網膜有 4 種感光細胞(M-Cone, L-Cone, S-cone, Rod)，小鼠視網膜有 3 種感光細胞(M/L-Cone, UV-cone, Rod)，考量擬人化之動物模型，因此以暗適應後之 Green light flash ERG 之變化，利用 M/L-Cone 和 Rod 細胞的混合波做為評估參考。

圖三十四為小鼠先餵予 300 mg/kg bw 之 WECF，再以 LED 光誘導其視網膜損傷模式下，其視網膜電流圖之變化。由空白組 a 波平均振幅與負控組有明顯差異，顯示 LED 照射造成小鼠視網膜損傷與變性，而餵予 WECF 組之 a 波平均振幅則介於兩者之間，且與負控組(NC)具有統計之顯著差異($p<0.05$)。另外在 b 波平均振幅亦有同樣現象。由於 ERG 是光線刺激視網膜後所產生電流反應的記錄。因此，視網膜電圖是臨床上診斷視網膜變性、營養不良、炎症、血管和中毒性疾病的有用工具。此外，ERG 的 a 波主要反映視網膜光感受器的電位變化，而 a 波來自光感受器而不是內核層及節細胞層，且 a 波是一個向下的負向波，振幅從等

電位線到曲線最低點的垂直距離。而 b 波是跟隨 a 波之後迅速上升的一個高大的正向波，起源於內核層的雙極細胞或 Muller 細胞，振幅從 a 波的最低點到角膜正波波峰的垂直距離。由圖三十四所得結果顯示，小鼠先餵予紅藜水萃取物具有保護小鼠視網膜經 LED 照射所產生損傷與變性現象。

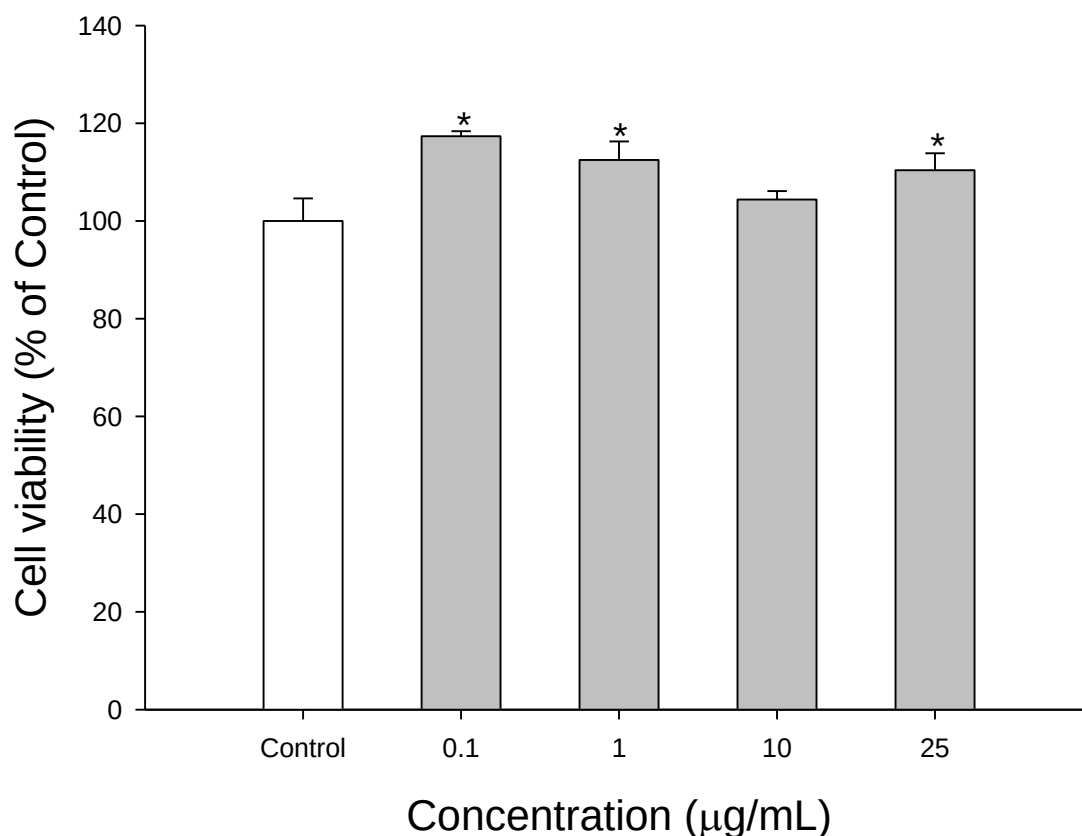
綜合上述，小鼠先管餵待測物後，再以 LED 光源誘發試驗模式之結果顯示，在抑制氧化與抗氧化指標測定、病理組織變化上，quercetin，betanin 與高濃度之紅藜水萃取物之表現皆優於負控組(NC)。再者，由視覺敏銳度、視覺對比敏感度與視網膜電流圖儀之評估結果亦顯示紅藜水萃取物具有保護視網膜作用。由本模式試驗顯示小鼠餵予紅藜水萃取物具有預防 LED 光源誘發視網膜損傷與破壞作用。

結論

由 *in vitro* 試驗結果顯示紅藜水萃取物與其活性成分具有抗藍光之 LED 誘發光氧化破壞特性。另由 *in vivo* 試驗結果，顯示紅藜水萃取物與其活性成分之 quercetin 與 betanin 可減緩 LED 照射引發視網膜損傷。

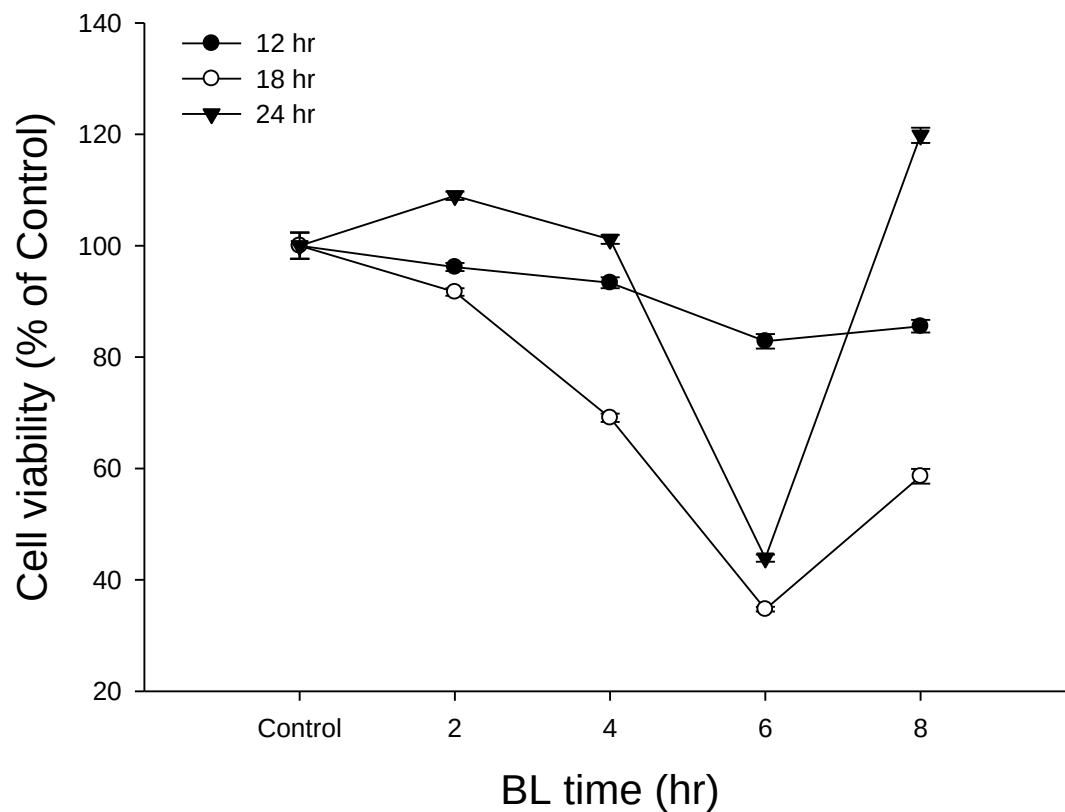
綜合上述二年之 *in vitro* 與 *in vivo* 試驗結果，證實紅藜水萃取物與其活性成分對 LED 光源誘發視網膜傷害之有保護效應。

圖表

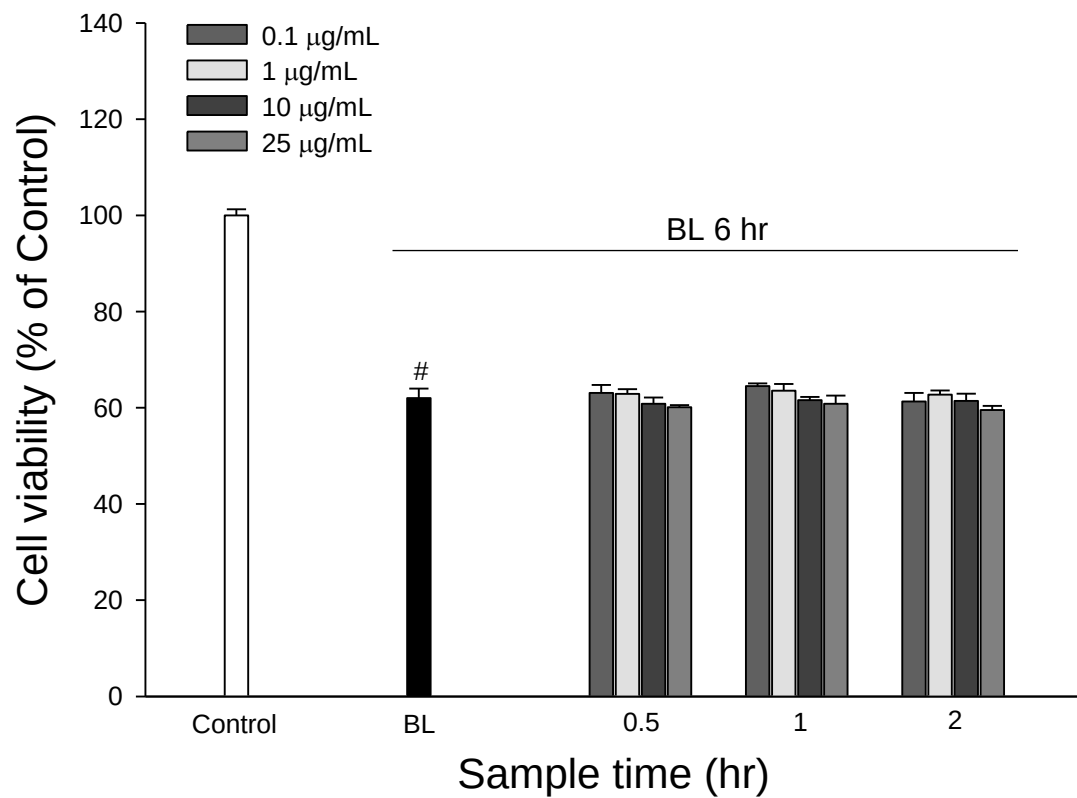


圖一、紅藜水萃取物與 ARPE-19 細胞反應 24hr 之細胞生存性

Figure 1. Effect of water extract of djulis (WECF) on AREP-19 cell viability. The cells were treated with WECF for 24 h. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). $^{*}(p < 0.05)$ compared with the control group.

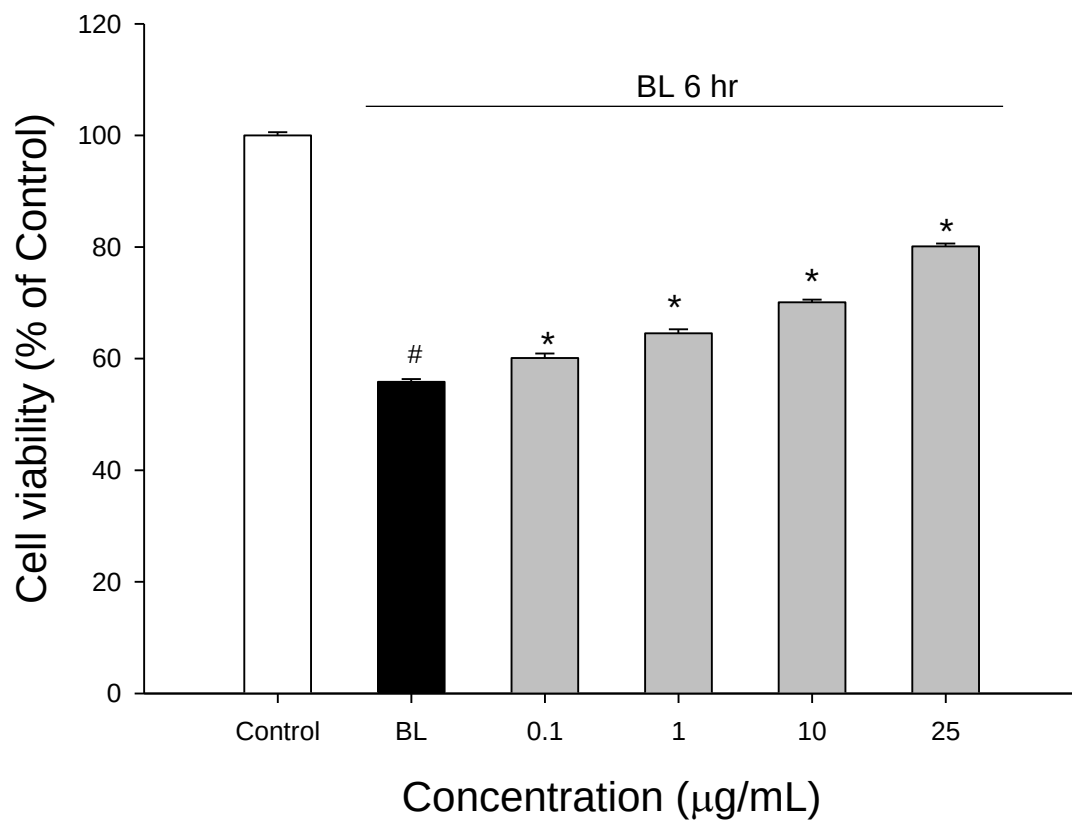


圖二、藍光(BL)對 ARPE-19 細胞照射不同時間後培養不同時間之細胞生存性
Figure 2. Effect of BL exposure of different times on AREP-19 cell viability incubated for various times. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3).



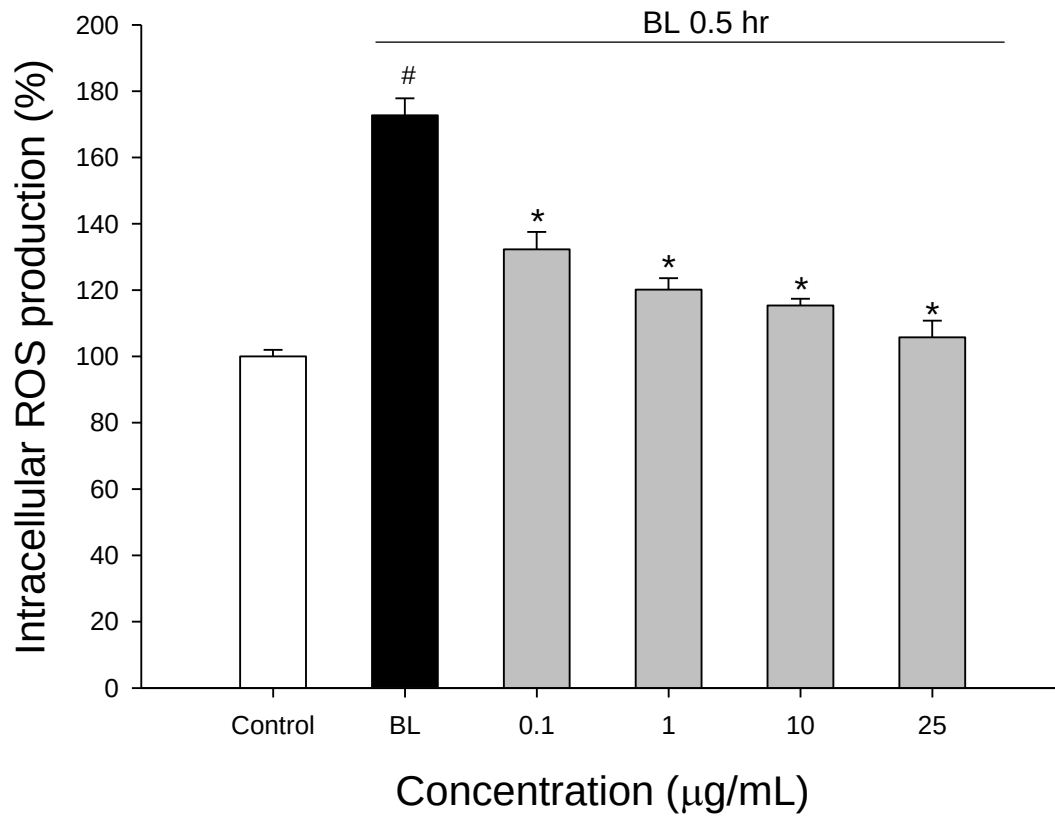
圖三、紅藜水萃取物與 ARPE-19 預處理不同時間再經 BL 照射 6 小時而後培養 18 小時之細胞存活率

Figure 3. Effect of water extract of djulis (WECF) on AREP-19 cell viability induced by exposure to BL for 6 hr. The cells were pretreated with WECF for different times and then incubated for 18 hr after the cells were exposed to BL irradiation for 6 hr. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). [#]($p < 0.05$), compared to the control.



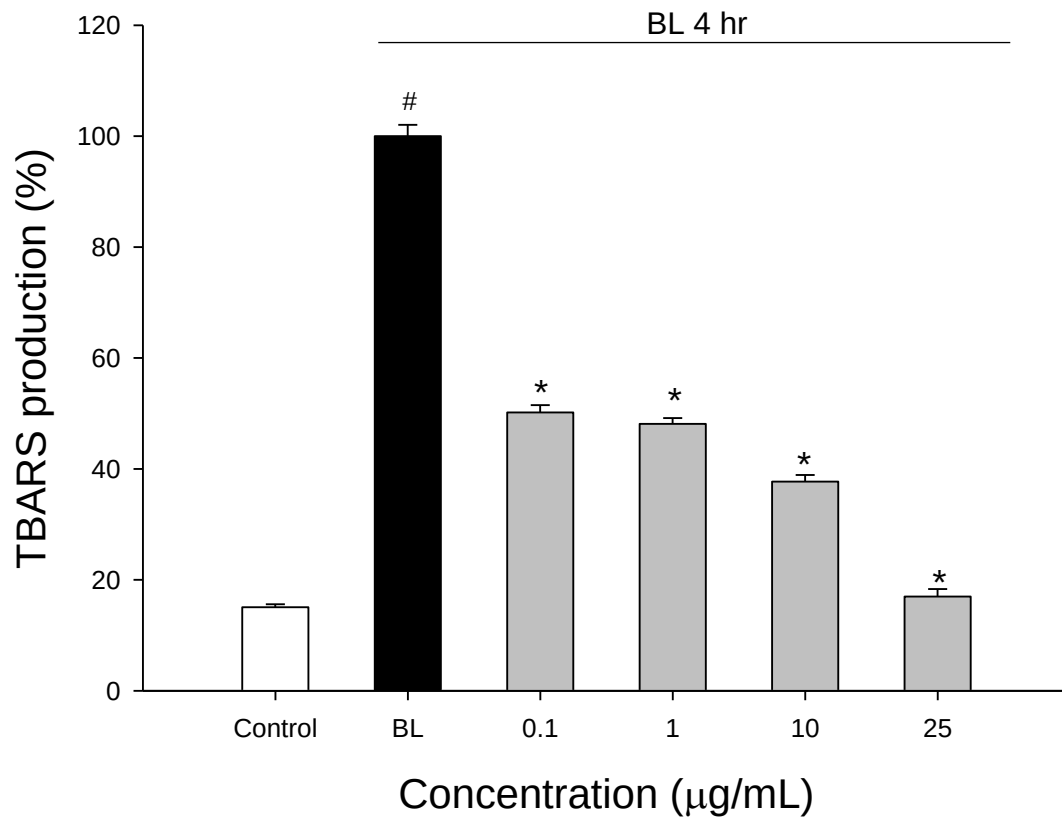
圖四、紅藜水萃取物與 BL 照射 6 小時之 ARPE-19 細胞反應 18 小時對其細胞生存性之影響

Figure 4. Effect of water extract of djulis (WECF) on AREP-19 cell viability induced by exposure to BL for 6 hr and then the cells were treated with samples for 18 hr. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). #($p < 0.05$), compared to the control, and *($p < 0.05$), compared to the BL group.



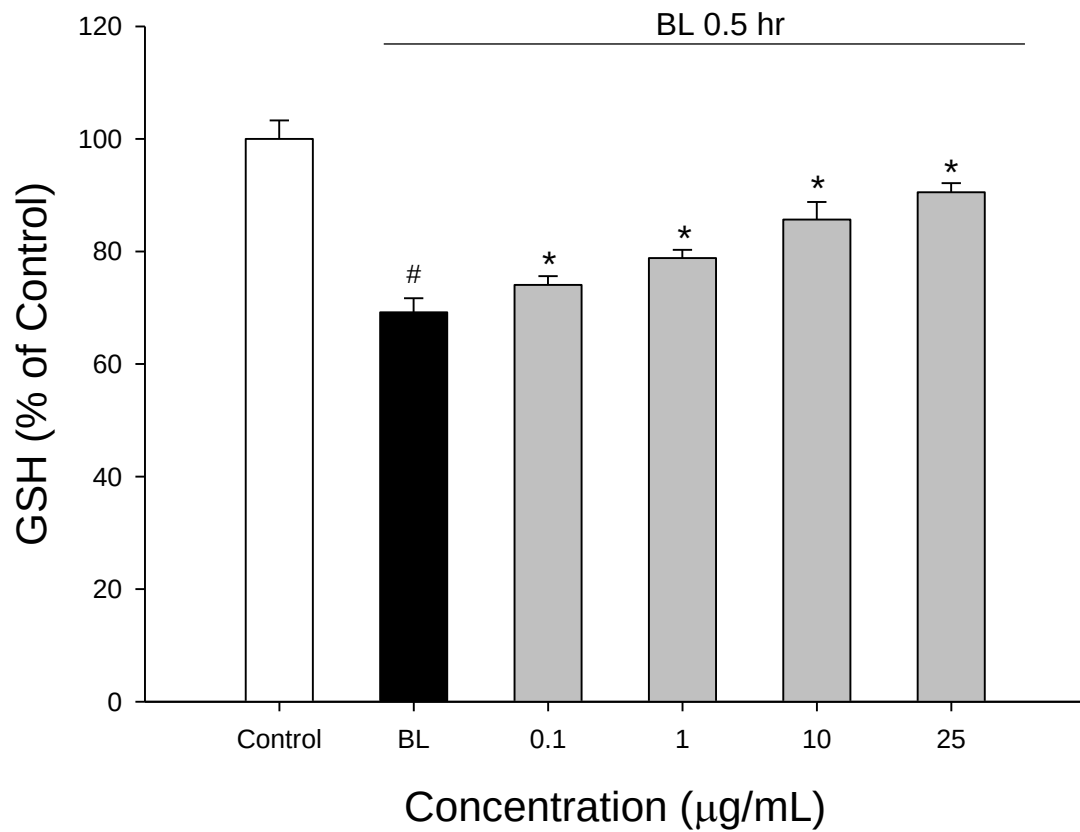
圖五、紅藜水萃取物與 BL 照射 0.5 小時之 ARPE-19 細胞反應 1 小時對其 ROS 生成之影響

Figure 5. Effects of water extract of djulis (WECF) on reactive oxygen species (ROS) in BL-induced AREP-19 cells for 0.5 hr and then the cells were treated with different concentrations of WECF for 1 hr. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). #($p < 0.05$), compared to the control, and *($p < 0.05$), compared to the BL group.



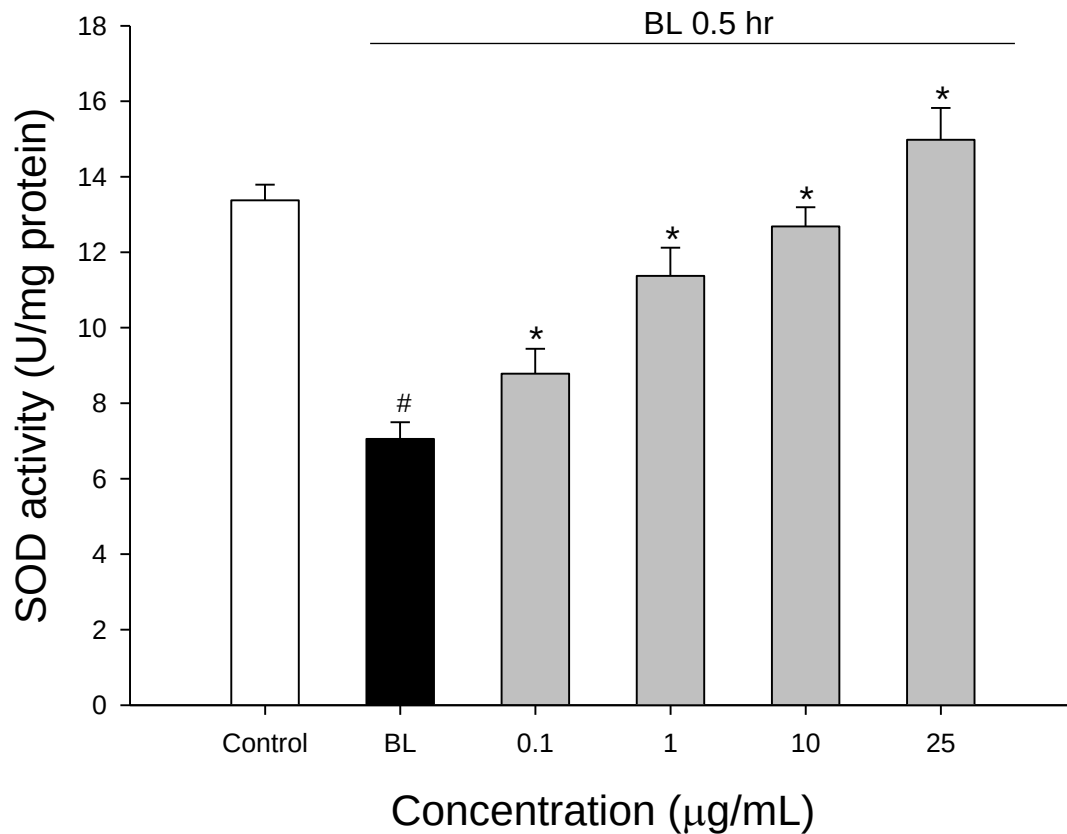
圖六、紅藜水萃取物與 BL 照射 4 小時之 ARPE-19 細胞反應 1 小時對其 TBARS 生成之影響

Figure 6. Effects of water extract of djulis (WECF) on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in BL-induced AREP-19 cells for 4 hr and then the cells were treated with different concentrations of WECF for 1 hr. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). #($p < 0.05$), compared to the control, and *($p < 0.05$), compared to the BL group.



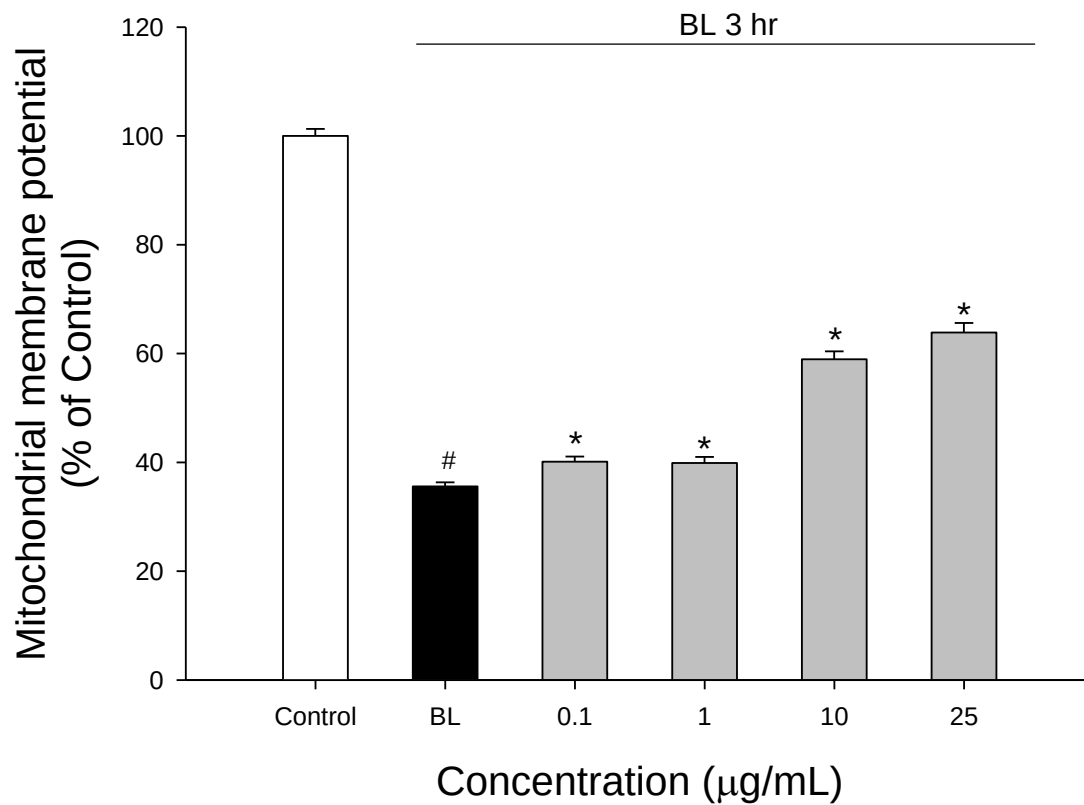
圖七、紅藜水萃取物與 BL 照射 0.5 小時之 ARPE-19 細胞反應 1 小時對其 GSH 之影響

Figure 7. Effects of water extract of djulis (WECF) on glutathione (GSH) in BL-induced AREP-19 cells for 0.5 hr and then the cells were treated with different concentrations of WECF for 1 hr. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). #($p < 0.05$), compared to the control, and *($p < 0.05$), compared to the BL group.



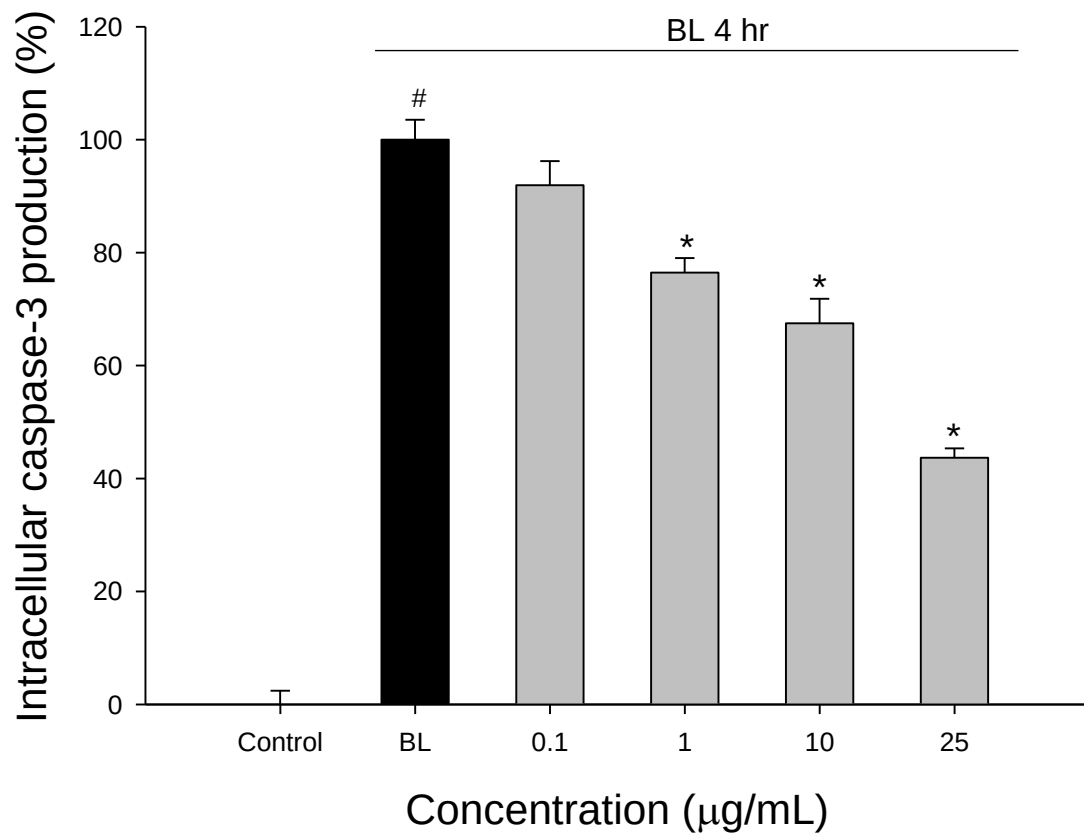
圖八、紅藜水萃取物與 BL 照射 0.5 小時之 ARPE-19 細胞反應 4 小時對其 SOD 之影響

Figure 8. Effects of water extract of djulis (WECF) on superoxide dismutase (SOD) in BL-induced AREP-19 cells for 0.5 hr and then the cells were treated with different concentrations of WECF for 4 hr. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). #($p < 0.05$), compared to the control, and *($r < 0.05$), compared to the BL group.



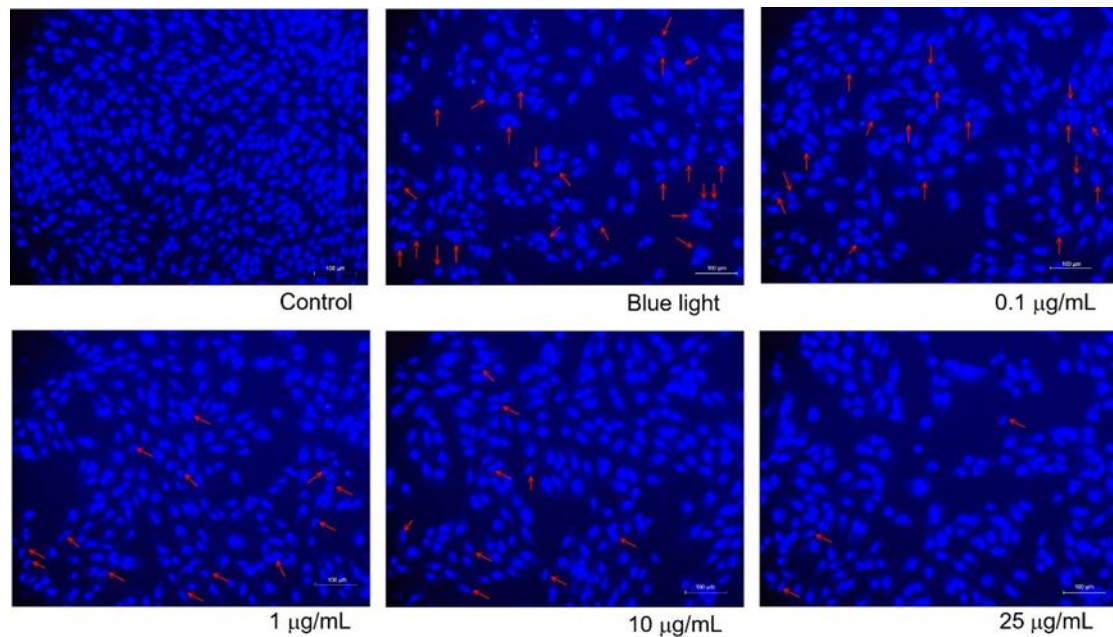
圖九、紅藜水萃取物與 BL 照射 3 小時之 ARPE-19 細胞反應 15 分鐘對其粒線體膜電位之影響

Figure 9. Effects of water extract of djulis (WECF) on mitochondrial membrane potential (MMP) in BL-induced AREP-19 cells for 3 hr and then the cells were treated with different concentrations of WECF for 15 min. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). #($p < 0.05$), compared to the control, and *($p < 0.05$), compared to the BL group.



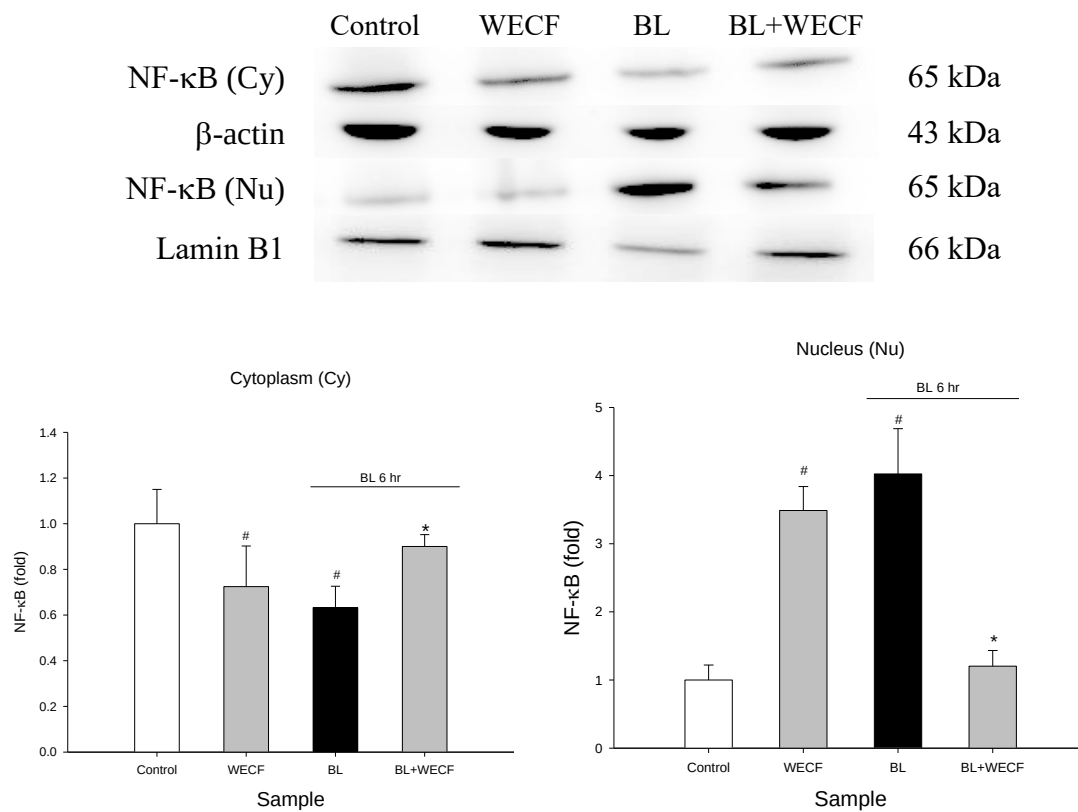
圖十、紅藜水萃取物與 BL 照射 4 小時之 ARPE-19 細胞反應 2 小時對 Caspase-3 之影響

Figure 10. Effects of water extract of djulis (WECEF) on Caspase-3 in BL-induced AREP-19 cells for 4 hr and then the cells were treated with different concentrations of WECEF for 2 hr. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). #($p < 0.05$), compared to the control, and *($p < 0.05$), compared to the BL group.



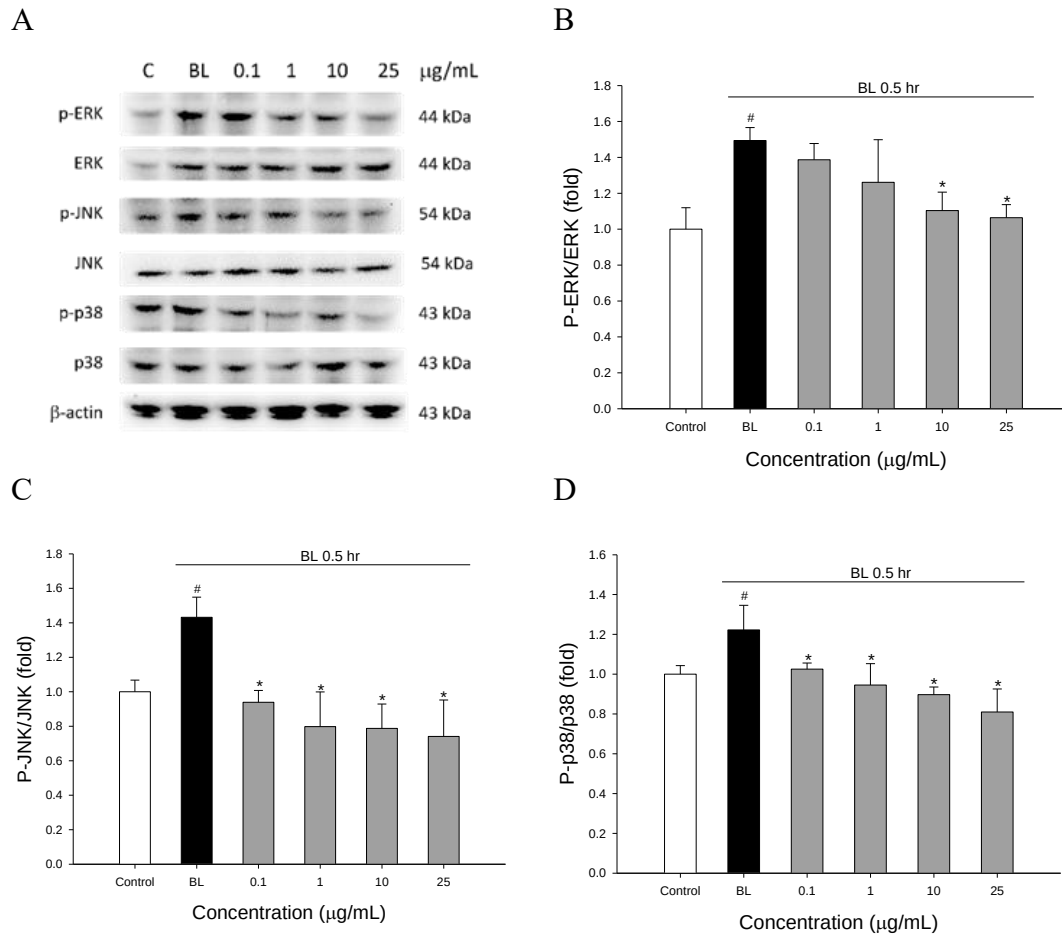
圖十一、紅藜水萃取物與 BL 照射 4 小時之 ARPE-19 細胞反應 2 小時後之 DAPI 染色。

Figure 11. Effects of water extract of djulis (WECF) on DAPI staining in blue light (BL)-induced ARPE-19 cells. The cells were exposed to blue light for 4 hr and then treated with WECF for 2 hr, respectively. The arrows demonstrated shrinkage and rounding of apoptotic cells. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3).



圖十二、紅藜水萃取物與 BL 照射 6 小時之 ARPE-19 細胞反應 15 小時對後 NF-κB 訊息路徑之影響

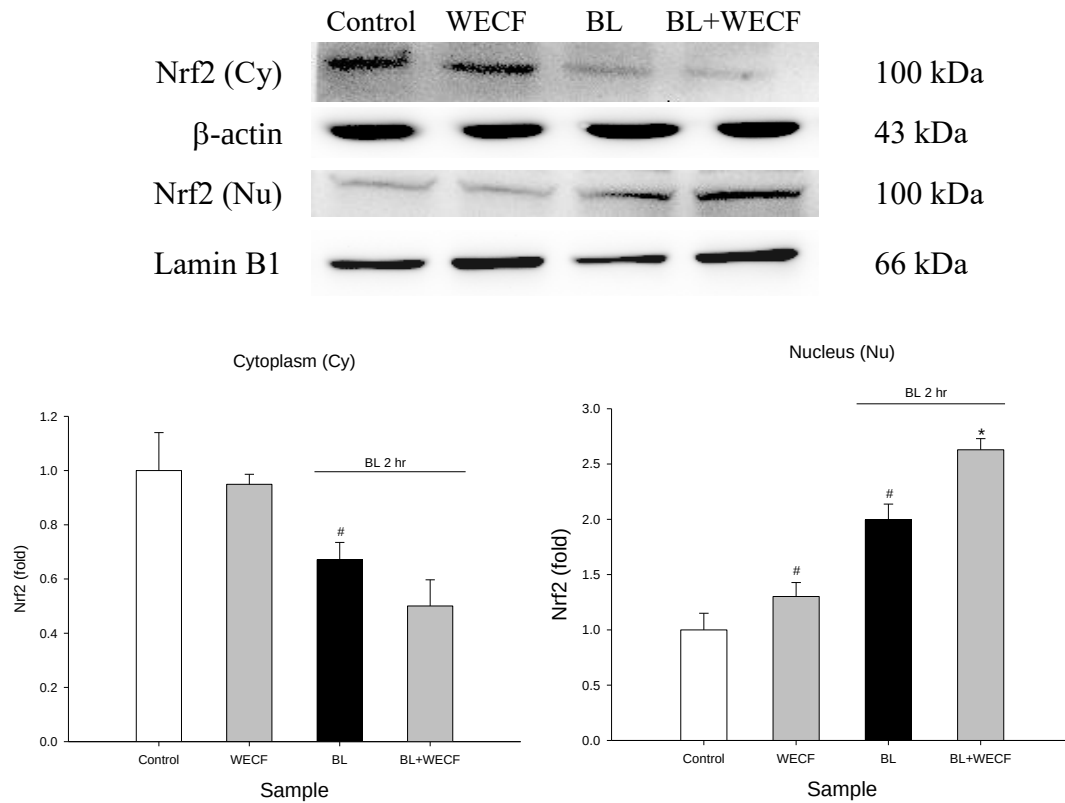
Figure 12. Effects of water extracts of djulis (WECF) on NF-κB signaling pathway in blue light (BL)-induced ARPE-19 cells. The cells were exposed to blue light for 6 hr and then treated with WECF for 15 hr. #($p < 0.05$) compared to the control group, and *($p < 0.05$) compared to blue light (BL)-induced cells alone. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3).



圖十三、紅藜水萃取物與 BL 照射 0.5 小時之 AREP-19 細胞反應 2 小時對 MAPK 之影響

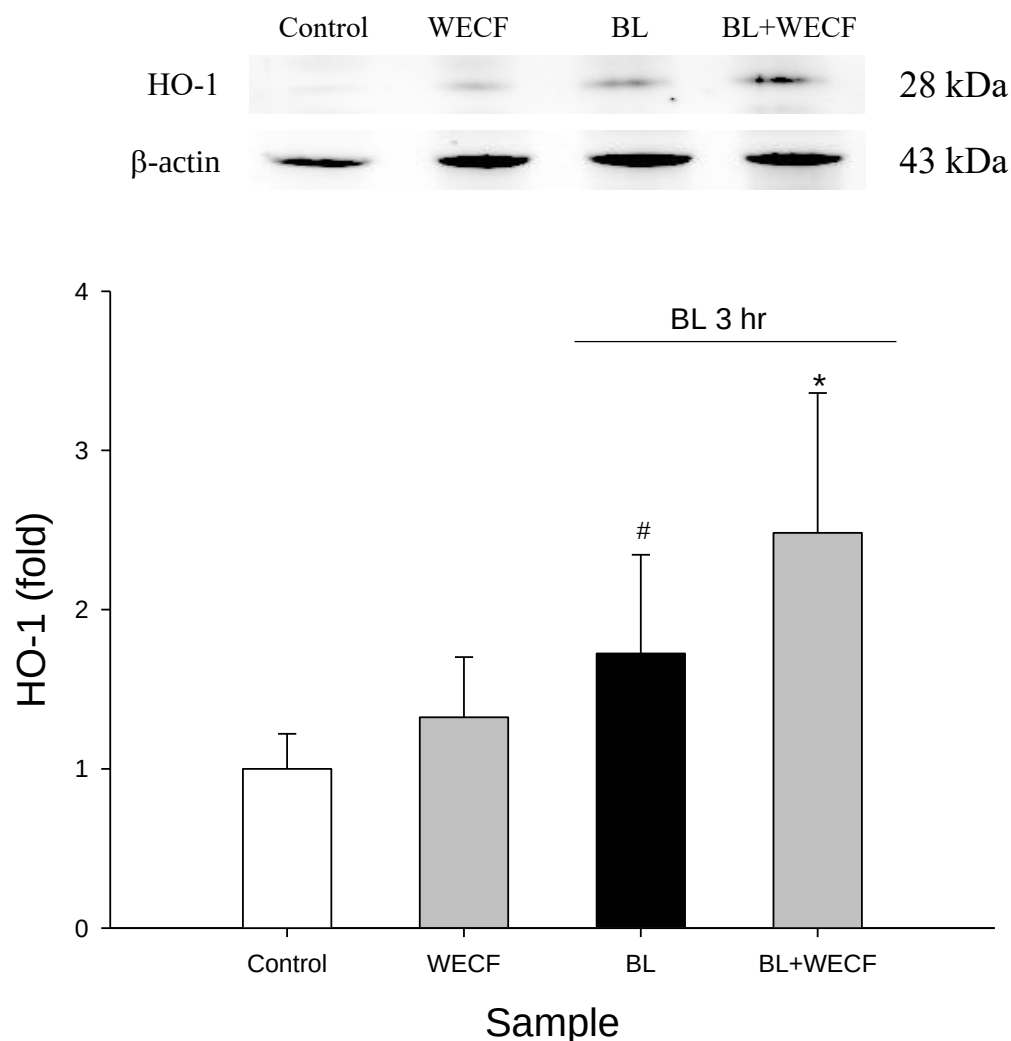
Figure 13. Western blot analysis of MAPKs in the AREP-19 cells exposure to BL for 0.5 h, and then coincubated with WECF for 2 hr. (A)-(D) Protein expression of key proteins in p38, JNK, and ERK pathways measured with western blotting.

Cells were irradiated by BL for 0.5 hr, and then treated with WECF (0.1-25 μg/mL) for 2 hr. Data are presented by means ± SD (n=3). [#]($p < 0.05$), compared to the control, and ^{*}($p < 0.05$), compared to the BL group. p-p38, phospho-p38; p-JNK, phospho-JNK; p-ERK, phosphor-ERK.



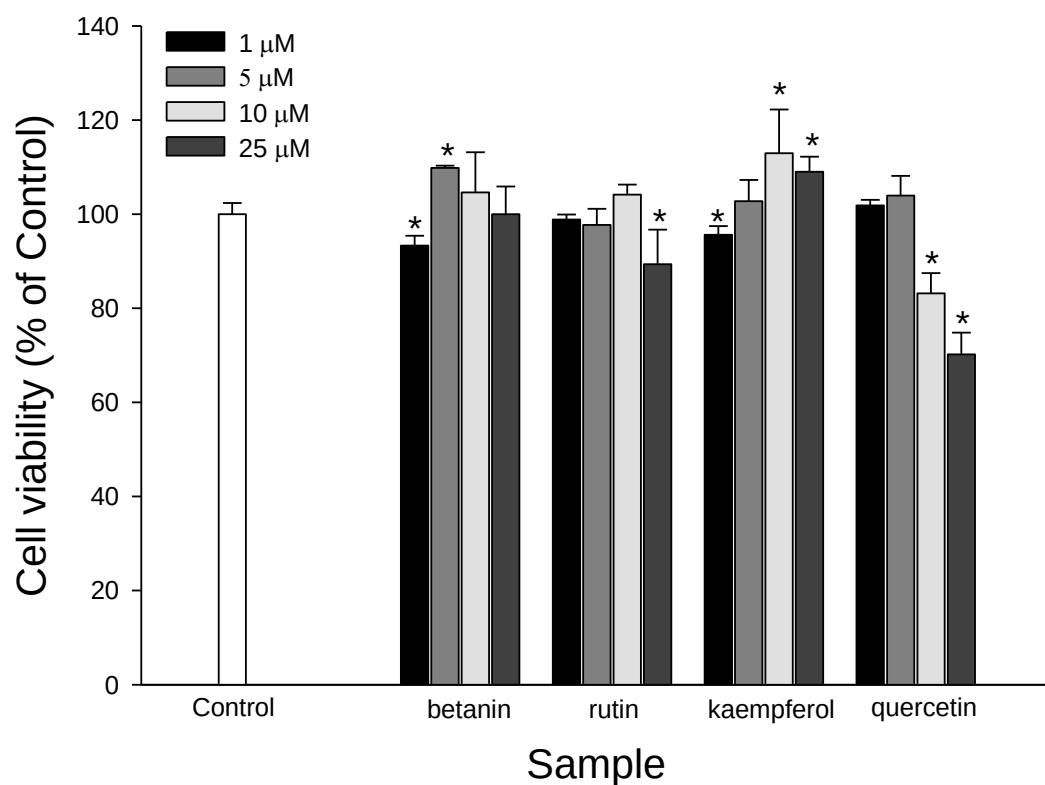
圖十四、紅藜水萃取物與 BL 照射 2 小時之 ARPE-19 細胞反應 14 小時對 Nrf2 蛋白表達之影響

Figure 14. Effects of water extracts of djulis (WECF) on Nrf2 protein expression in blue light (BL)-induced ARPE-19 cells. The cells were exposed to blue light for 2 hr and then treated with WECF for 14 hr. Data are presented by means $\pm$ SD ($n=3$). [#]($p < 0.05$), compared to the control, and ^{*}($p < 0.05$), compared to the BL group.



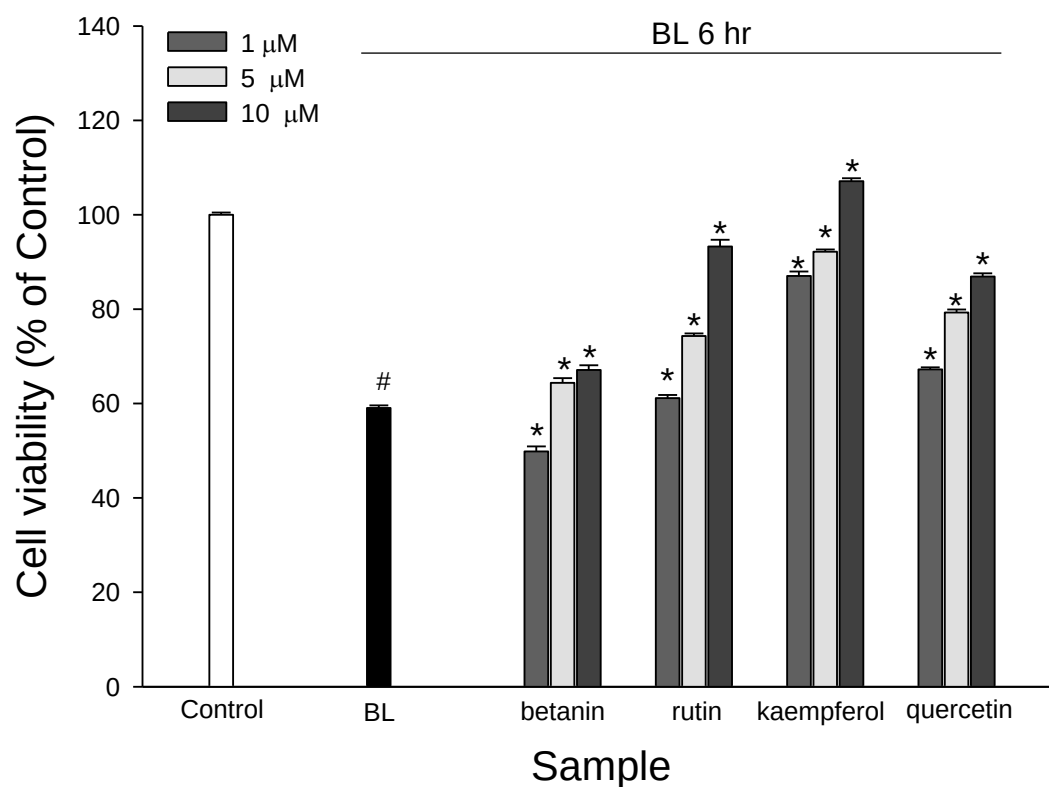
圖十五、紅藜水萃取物與 BL 照射 3 小時之 ARPE-19 細胞反應 16 小時對血紅素氧化酶-1(HO-1)蛋白表達之影響

Figure 15. Effects of water extracts of djulis (WECF) on heme oxygenase-1 (HO-1) protein expression in blue light (BL)-induced ARPE-19 cells. Effects of WECF on blue light (BL)-induced HO-1 activity in ARPE-19 cells. The cells were exposed to blue light for 3 hr and then treated with WECF for 16 hr. #($p < 0.05$) compared to the control group, and *($p < 0.05$) compared to blue light (BL)-induced cells alone. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3).



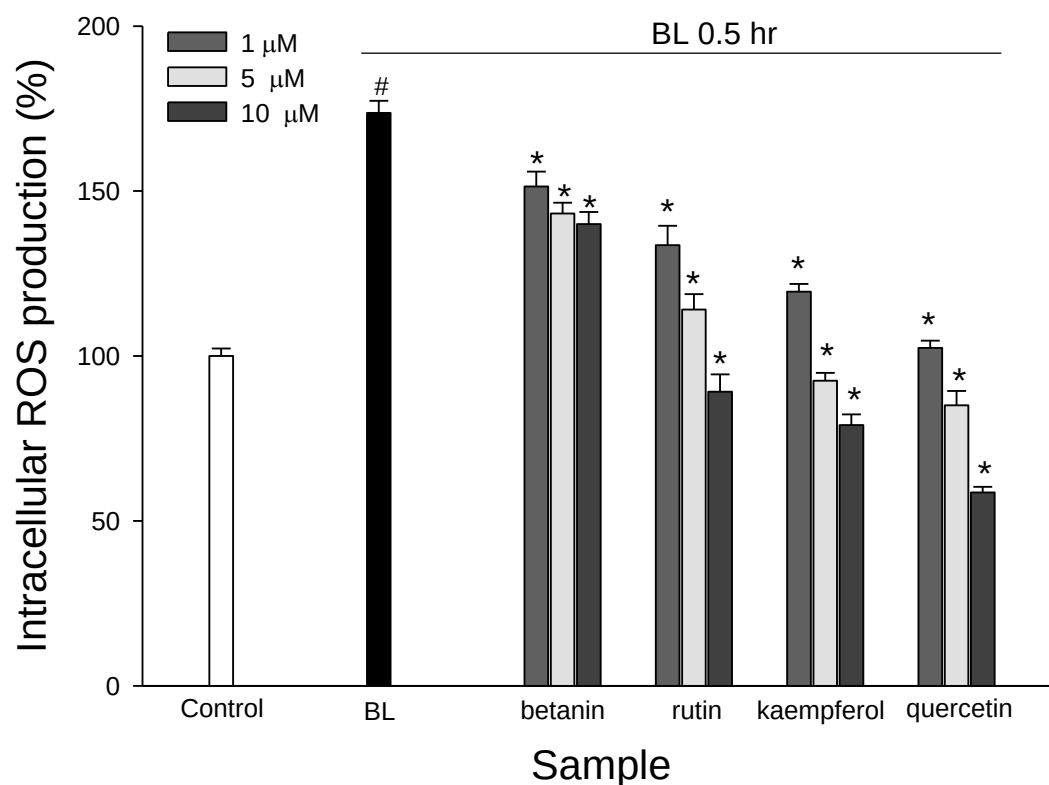
圖十六、甜菜鹼(betanin)、芸香苷(rutin)、山奈酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)與 ARPE-19 細胞反應 24hr 之細胞生存性

Figure 16. Effect of betanin, rutin, kaempferol and quercetin on AREP-19 cell viability. The cells were treated with samples for 24 hr. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). *($p < 0.05$) compared with the control group.



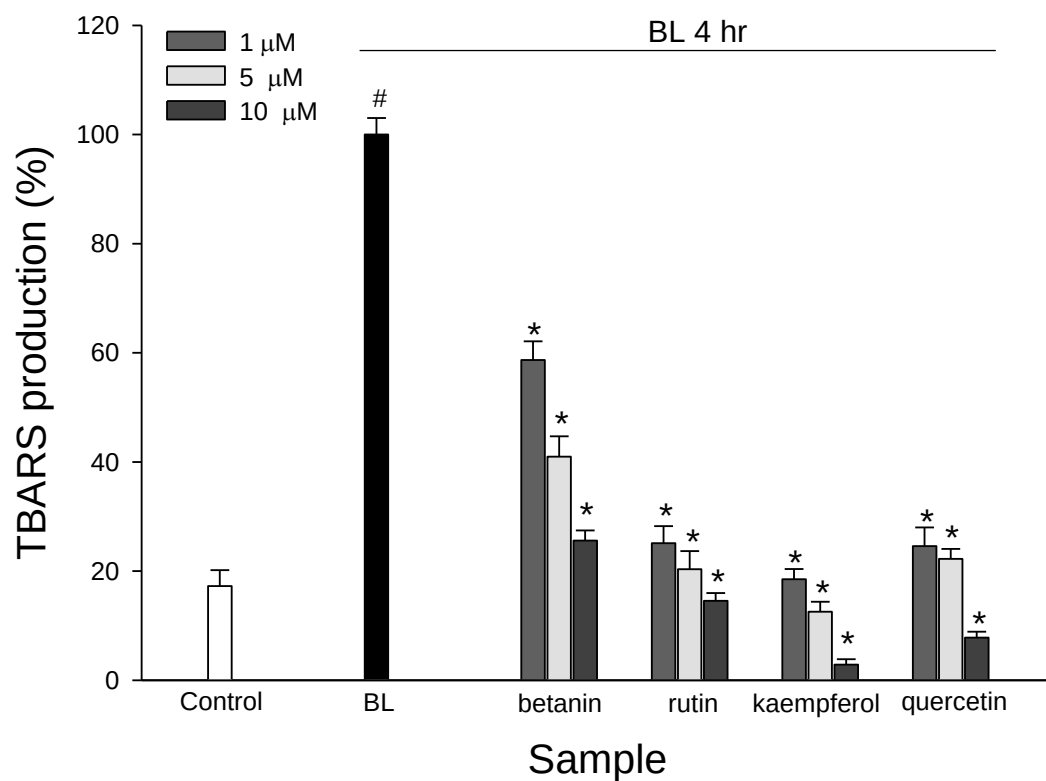
圖十七、甜菜鹼(betanin)、芸香苷(rutin)、山奈酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)與 BL 照射 6 小時之 ARPE-19 細胞反應 18 小時對細胞生存性之影響

Figure 17. Effect of betanin, rutin, kaempferol and quercetin on AREP-19 cell viability induced by exposure to BL for 6 hr and then the cells were treated with samples for 18 hr. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). [#]($p < 0.05$), compared to the control, and ^{*}($p < 0.05$), compared to the BL group.



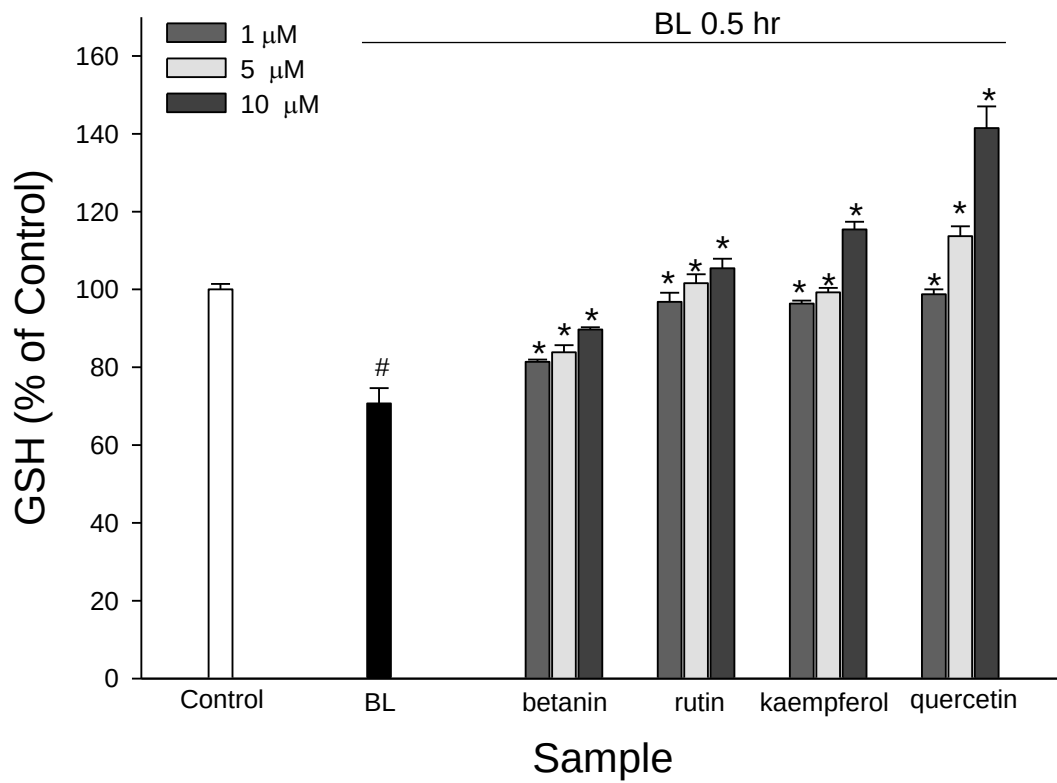
圖十八、甜菜鹼(betanin)、芸香苷(rutin)、山柰酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)與 BL 照射 0.5 小時之 ARPE-19 細胞反應 1 小時對其 ROS 生成之影響

Figure 18. Effects of betanin, rutin, kaempferol and quercetin on reactive oxygen species (ROS) in BL-induced AREP-19 cells for 0.5 hr and then the cells were treated with different concentrations of samples for 1 hr. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). [#]($p < 0.05$), compared to the control, and ^{*}($p < 0.05$), compared to the BL group.



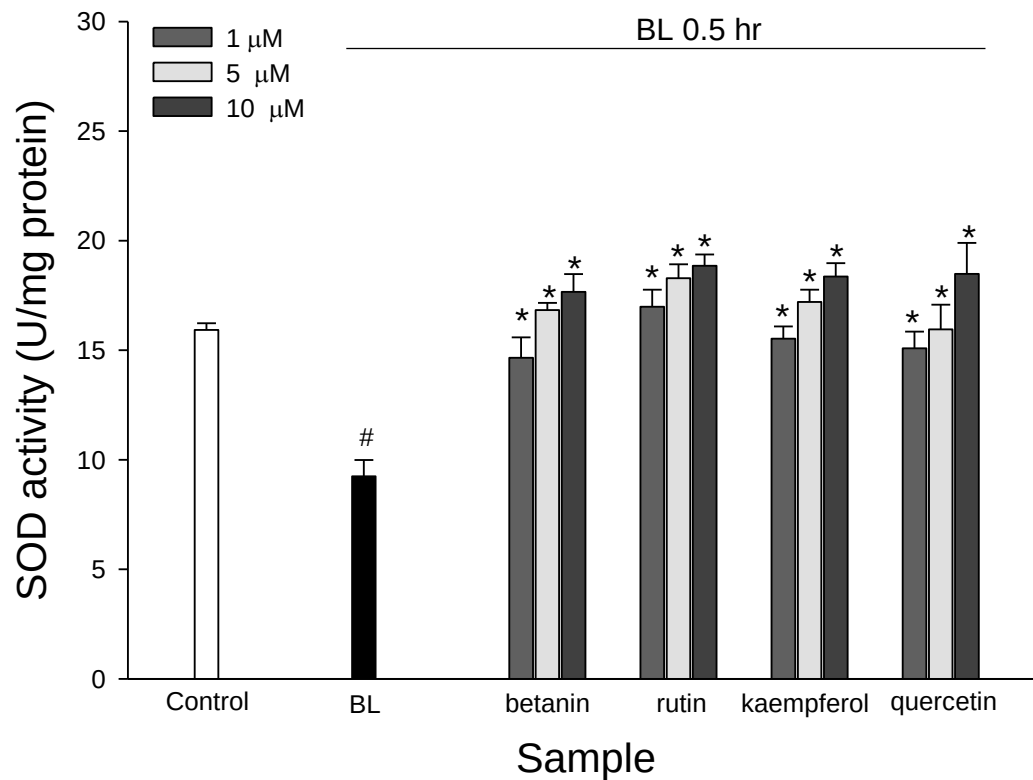
圖十九、甜菜鹼(betanin)、芸香苷(rutin)、山奈酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)與 BL 照射 4 小時之 ARPE-19 細胞反應 1 小時對其 TBARS 生成之影響

Figure 19. Effects of betanin, rutin, kaempferol and quercetin on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in BL-induced AREP-19 cells for 4 hr and then the cells were treated with different concentrations of samples for 1 hr. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). [#]($p < 0.05$), compared to the control, and ^{*}($p < 0.05$), compared to the BL group.



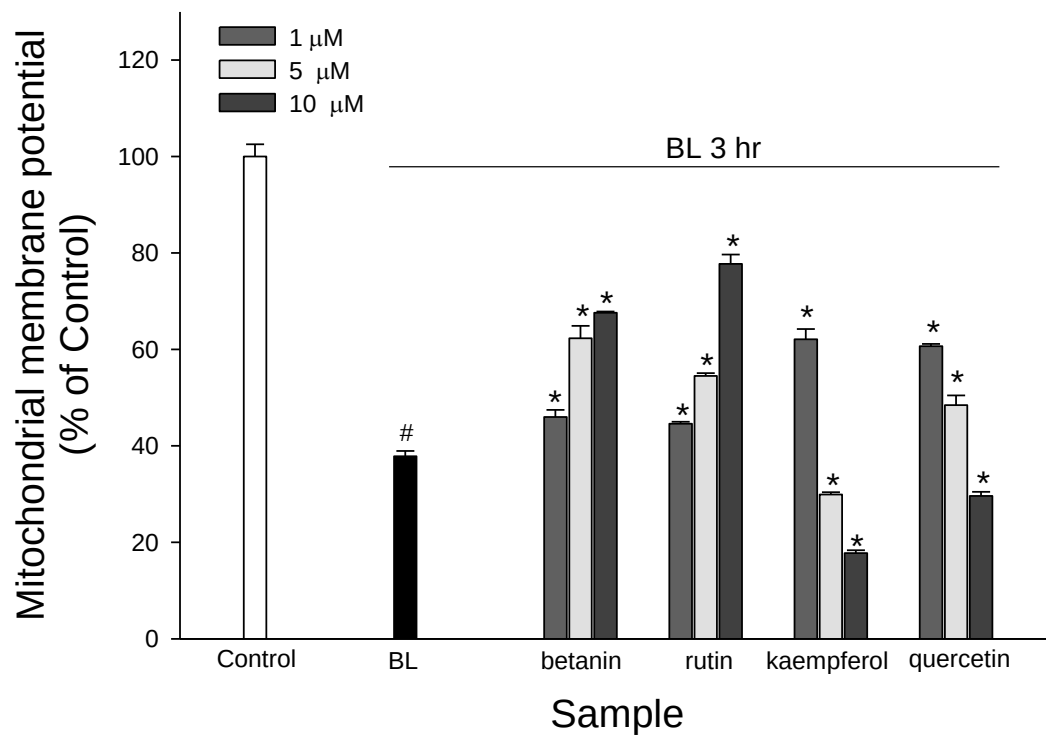
圖二十、甜菜鹼(betanin)、芸香苷(rutin)、山奈酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)與 BL 照射 0.5 小時之 ARPE-19 細胞反應 1 小時對其 GSH 之影響

Figure 20. Effects of betanin, rutin, kaempferol and quercetin on glutathione (GSH) in BL-induced AREP-19 cells for 0.5 hr and then the cells were treated with different concentrations of samples for 1 hr. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). [#]($p < 0.05$), compared to the control, and ^{*}($p < 0.05$), compared to the BL group.



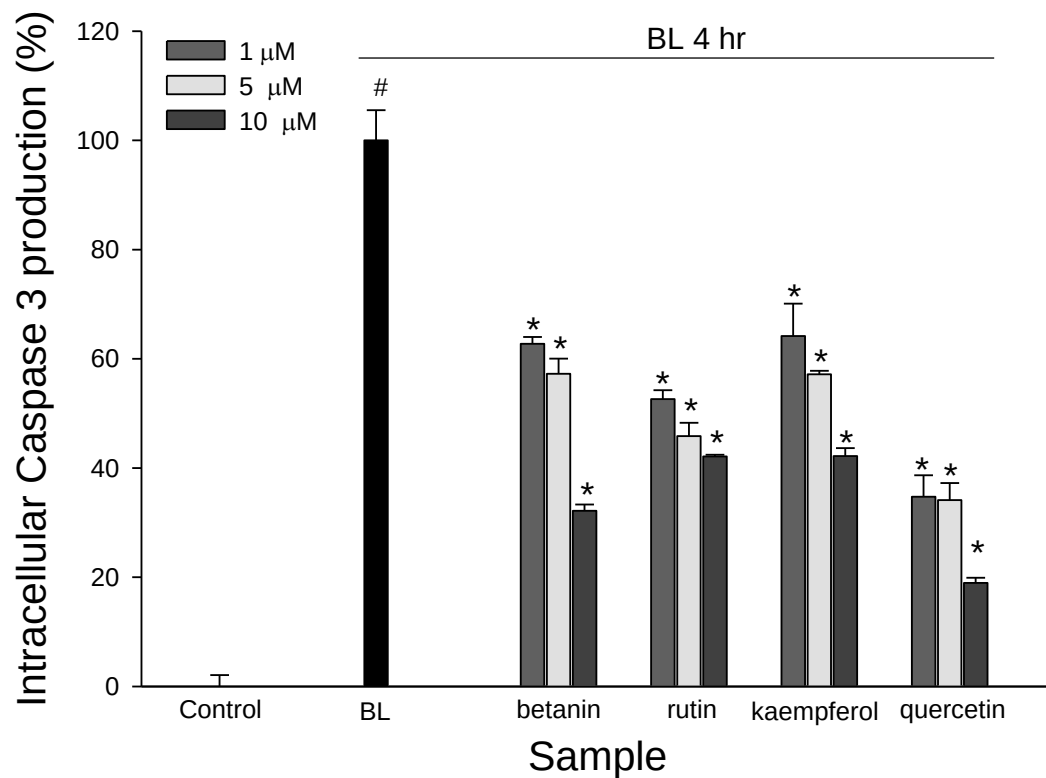
圖二十一、甜菜鹼(betanin)、芸香苷(rutin)、山奈酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)與 BL 照射 0.5 小時之 ARPE-19 細胞反應 4 小時對其 SOD 之影響

Figure 21. Effects of betanin, rutin, quercetin, and kaempferol on blue light (BL)-induced SOD activity in ARPE-19 cells. The cells were exposed to blue light for 0.5 hr and then treated with bioactive compounds for 4 hr. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). [#]($p < 0.05$), compared to the control, and ^{*}($p < 0.05$), compared to the BL group.



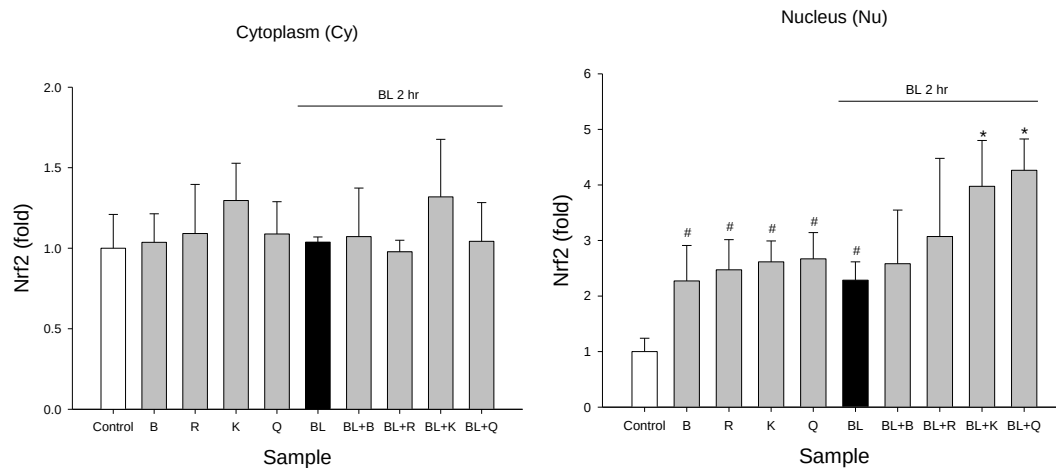
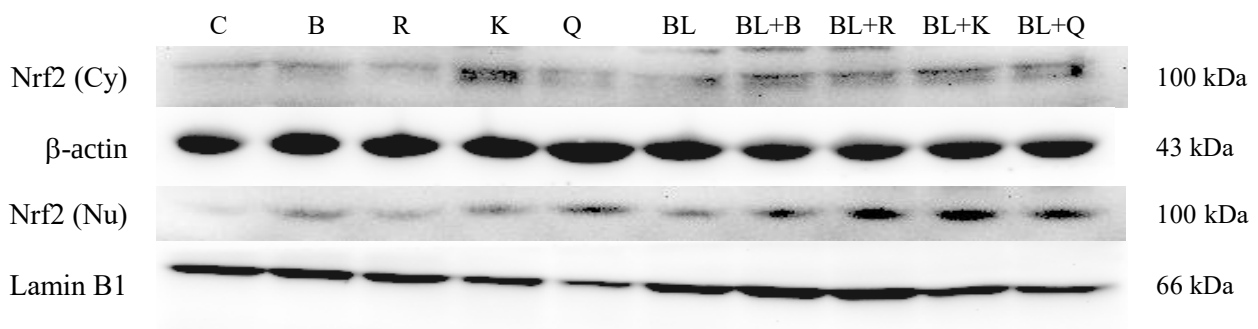
圖二十二、甜菜鹼(betanin)、芸香苷(rutin)、山奈酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)與 BL 照射 3 小時之 ARPE-19 細胞反應 15 分鐘對粒線體膜電位之影響

Figure 22. Effects of betanin, rutin, kaempferol and quercetin on mitochondrial membrane potential (MMP) in BL-induced AREP-19 cells for 3 hr and then the cells were treated with different concentrations of samples for 15 min. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). [#]($p < 0.05$), compared to the control, and ^{*}($p < 0.05$), compared to the BL group.



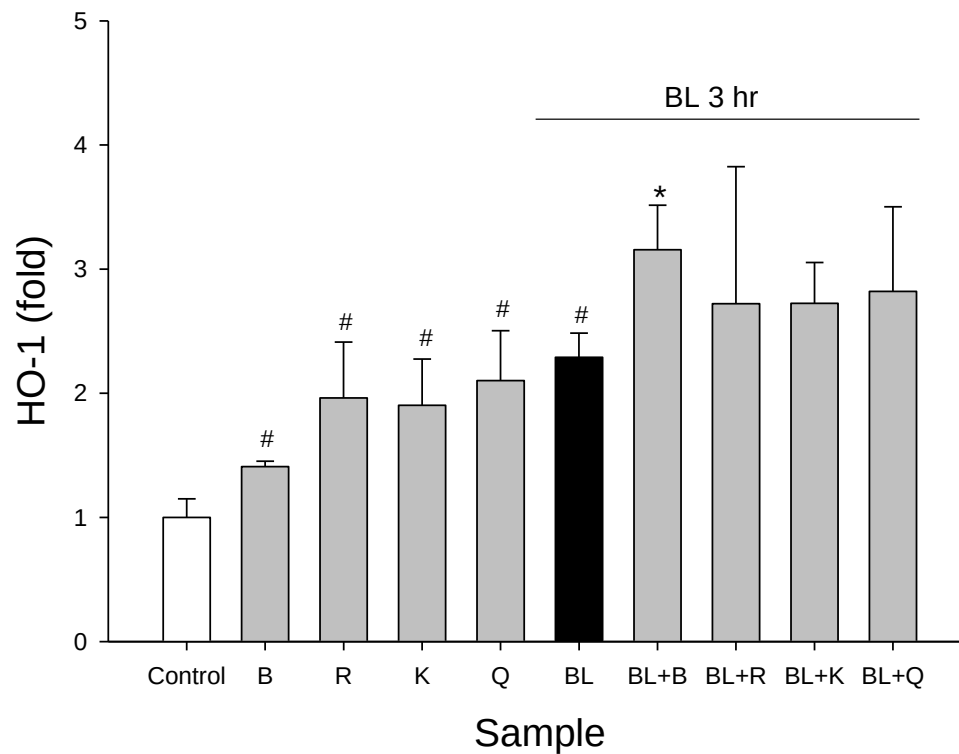
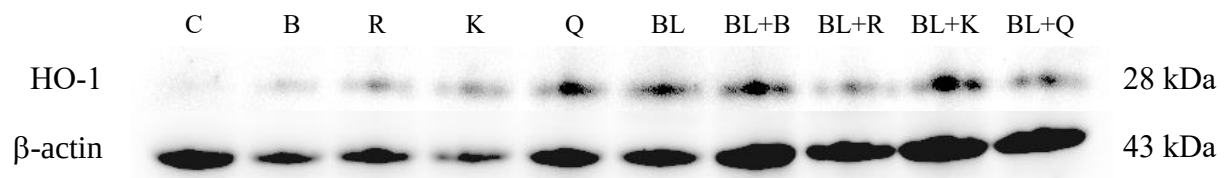
圖二十三、甜菜鹼(betanin)、芸香苷(rutin)、山奈酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)與 BL 照射 4 小時之 ARPE-19 細胞反應 2 小時對 Caspase-3 之影響

Figure 23. Effects of betanin, rutin, kaempferol and quercetin on Caspase-3 in BL-induced AREP-19 cells for 4 hr and then the cells were treated with different concentrations of samples for 2 hr. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). [#]($p < 0.05$), compared to the control, and ^{*}($p < 0.05$), compared to the LED group.



圖二十四、甜菜鹼(betainin)、芸香苷(rutin)、山奈酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)與 BL 照射 2 小時之 ARPE-19 細胞反應 14 小時對 Nrf2 蛋白表達之影響

Figure 24. Effects of betanin, rutin, kaempferol and quercetin on Nrf2 protein expression in blue light (BL)-induced ARPE-19 cells. The cells were exposed to blue light for 2 hr and then treated with WECF for 14 hr. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). [#]($p < 0.05$), compared to the control, and ^{*}($p < 0.05$), compared to the BL group.



圖二十五、甜菜鹼(betanin)、芸香苷(rutin)、山奈酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)與 BL 照射 3 小時之 ARPE-19 細胞反應 16 小時對對血紅素氧化酶-1(HO-1)蛋白表達之影響

Figure 25. Effects of betanin, rutin, kaempferol and quercetin on heme oxygenase-1 (HO-1) protein expression in blue light (BL)-induced ARPE-19 cells. The cells were exposed to blue light for 3 hr and then treated with WECF for 16 hr. Data are presented by means $\pm$ SD (n=3). #($p < 0.05$), compared to the control, and *($p < 0.05$), compared to the BL group.

表一 以 LED 先誘發小鼠，再餵予紅藜水萃取物(WECF)、槲皮素(quercetin)、甜菜鹼(betainin)，評估對小鼠血標記物的影響

Table 1. Effects of water extract of djulis (WECF), quercetin and betanin on biochemical examination of the plasma in mice following exposure to LED light

Groups	AST (U/L)	ALT (U/L)	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)
C	391.17±84.05	207.14±53.83	17.64±1.50	0.18±0.01
NC	340.33±69.15	215.29±93.14	18.25±0.91	0.19±0.02
QL	342.83±61.36	164.00±49.76	17.51±1.32	0.20±0.02
QH	743.00±206.31	284.71±95.43	16.09±0.86	0.21±0.01
BL	428.83±66.46	225.86±77.90	17.58±2.35	0.18±0.02
BH	872.17±355.44	324.71±101.87	16.36±0.69	0.20±0.02
WL	335.67±47.90	130.29±36.18	16.90±1.10	0.22±0.03
WM	452.67±122.49	208.29±65.02	16.58±0.93	0.21±0.01
WH	176.17±41.85	174.86±109.33	17.70±0.94	0.19±0.01

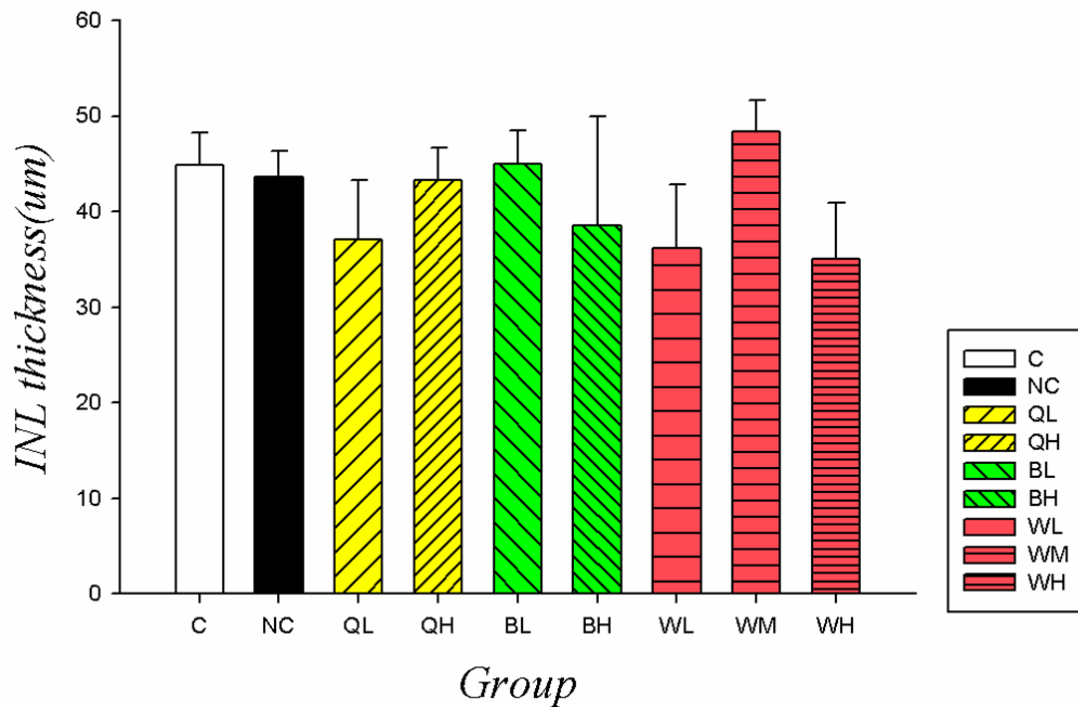
NC: negative control; QL: low dosage of quercetin; QH: high dosage of quercetin; BL: low dosage of betanin; BH: high dosage of betanin; WL: low dosage of water extracts of djulis; WM: medium dosage of water extracts of djulis; WH: high dosage of water extracts of djulis; AST: aspartate transaminase; ALT: alanine aminotransferase; BUN: blood urea nitrogen; CRE: creatinine. $^{*}(p < 0.05)$ compared to the control group by t-test. The different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$. Data are presented by means $\pm$ SD (n=8).

表二 以 LED 先誘發小鼠，再餵予紅藜水萃取物(WECF)、槲皮素(quercetin)、甜菜鹼(betainin)，評估對小鼠眼球氧化和抗氧化分析

Table 2. Effects of water extract of djulis (WECF), quercetin and betanin on lipid oxidation and antioxidant biomarkers in the eyeballs of mice following exposure to LED light

Groups	TBARS (nmol/g)	GSH (mmol/g)	SOD (U/g)
C	1289.14±76.01	3.76±0.17	3079.21±134.08
NC	1171.09±127.85	3.39±0.16	2654.88±198.10 ^{*a}
QL	1095.96±124.31	3.67±0.18	3018.22±121.72 ^{ab}
QH	1050.50±92.780	3.29±0.13	3405.83±122.83 ^{bc}
BL	1032.83±161.94	3.43±0.06	3396.06±243.06 ^{bc}
BH	942.55±52.55	3.44±0.24	3775.03±145.20 ^{cd}
WL	1169.46±137.43	3.20±0.11	3490.28±176.55 ^{bc}
WM	1157.58±45.90	3.24±0.12	3788.99±345.70 ^{cd}
WH	976.64±84.06	3.20±0.08	4315.22±218.91 ^d

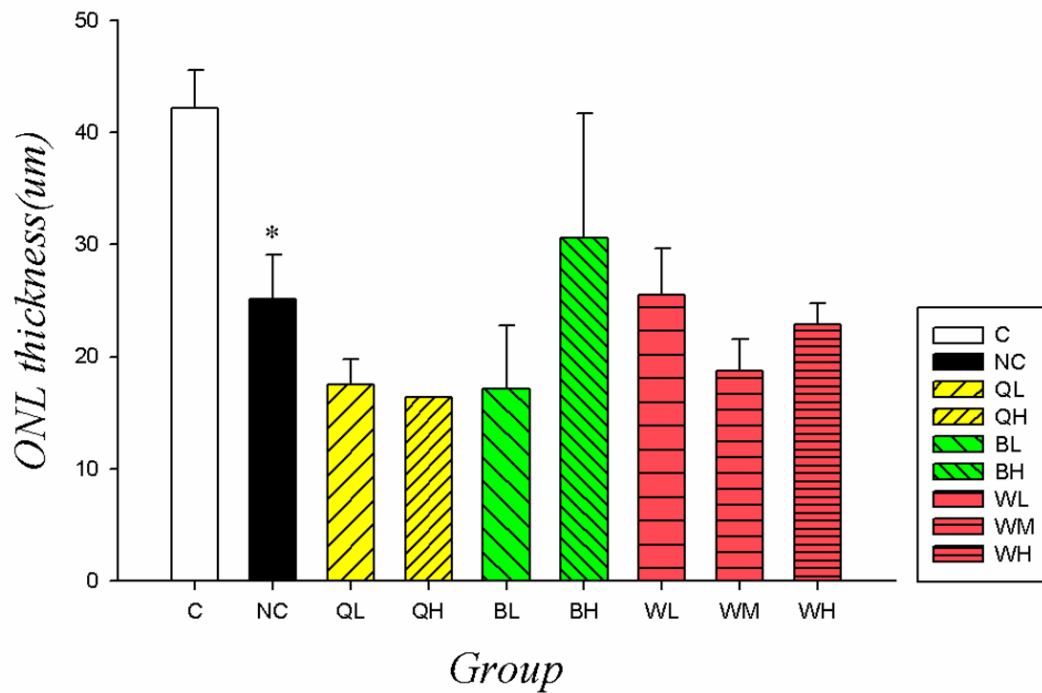
NC: negative control; QL: low dosage of quercetin; QH: high dosage of quercetin; BL: low dosage of betanin; BH: high dosage of betanin; WL: low dosage of water extracts of djulis; WM: medium dosage of water extracts of djulis; WH: high dosage of water extracts of djulis; TBARS: thiobarbituric acid substances; GSH: glutathione; SOD: superoxide dismutasealanine. $^{*}(p < 0.05)$ compared to the control group by t-test. The different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$. Data are presented by means $\pm$ SD (n=8).



圖二十六、以 LED 先誘發小鼠，再餵予紅藜水萃取物(WECF)、槲皮素(queracetin)、甜菜鹼(betainin)對視網膜內核層(INL)厚度之影響

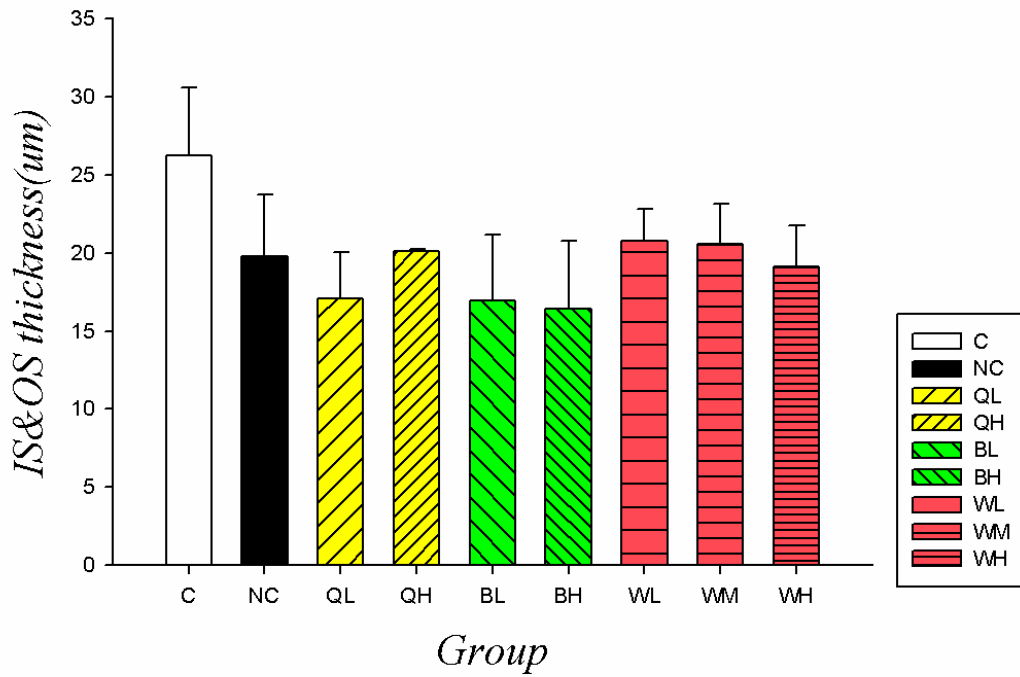
Figure 26. Effect of the oral administration of water extract of djulis (WECF), quercetin and betanin on retinal inner nuclear layer (INL) following exposure to LED in mice.

C: Control; NC: Negative control; QL: quercetin at 1 mg/kg bw; QH: quercetin at 10 mg/kg bw; BL: betanin at 1 mg/kg bw; BH: betanin at 10 mg/kg bw; WL: WECF at 10 mg/kg bw; WM: WECF at 50 mg/kg bw; WH: WECF at 100 mg/kg bw. $*(p < 0.05)$ compared to the control group by t-test. Data are presented by means $\pm$ SD (n=8).



圖二十七、以 LED 先誘發小鼠，再餵予紅藜水萃取物(WECF)、槲皮素(queracetin)、甜菜鹼(betainin)對視網膜外核層(ONL)厚度的影響

Figure 27. Effect of the oral administration of water extract of djulis (WECF), quercetin and betanin on retinal outer nuclear layer (ONL) following exposure to LED in mice. C: Control; NC: Negative control; QL: quercetin at 1 mg/kg bw; QH: quercetin at 10 mg/kg bw; BL: betanin at 1 mg/kg bw; BH: betanin at 10 mg/kg bw; WL: WECF at 10 mg/kg bw; WM: WECF at 50 mg/kg bw; WH: WECF at 100 mg/kg bw. $*(p < 0.05)$ compared to the control group by t-test. Data are presented by means $\pm$ SD (n=8).



圖二十八、以 LED 先誘發小鼠，再餵予紅藜水萃取物(WECF)、槲皮素(quercetin)、甜菜鹼(betain)對視網膜感光器內節與外節(inner and outer segments, IS&OS)厚度的影響

Figure 28. Effect of the oral administration of water extract of djulis (WECF), quercetin and betanin on inner and outer segments (IS&OS) in mice following exposure to LED.

C: Control; NC: Negative control; QL: quercetin at 1 mg/kg bw; QH: quercetin at 10 mg/kg bw; BL: betanin at 1 mg/kg bw; BH: betanin at 10 mg/kg bw; WL: WECF at 10 mg/kg bw; WM: WECF at 50 mg/kg bw; WH: WECF at 100 mg/kg bw. $*(p < 0.05)$ compared to the control group by t-test. Data are presented by means $\pm$ SD (n=8).

表三 先餵予紅藜水萃取物(WECF)、槲皮素(quercetin)、甜菜鹼(betainin)後，再以 LED 誘發小鼠，評估對其血漿生化標記物的影響

Table 3. Effects of the oral administration of water extract of djulis (WECF), quercetin and betanin on plasma biochemical markers in mice before exposure to LED light

Groups	AST (U/L)	ALT (U/L)	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)
C	354.13±46.81	92.63±19.57	20.65±1.37	0.23±0.43
NC	418.38±100.64	71.63±19.58	23.19±0.49	0.23±0.03
QL	381.25±140.92	76.13±24.82	21.96±0.99	0.28±0.02
QH	246.86±65.47	53.71±13.9	24.20±1.22	0.31±0.02
BL	393.88±128.5	69.75±17.36	22.26±2.11	0.31±0.01
BH	512.38±152.51	108.50±29.26	22.65±1.22	0.30±0.02
WL	621.25±203.99	96.50±27.09	21.09±1.25	0.32±0.01
WM	352.88±62.85	89.25±33.25	23.30±1.38	0.27±0.03
WH	421.50±134.00	177.00±76.90	20.65±1.37	0.30±0.01

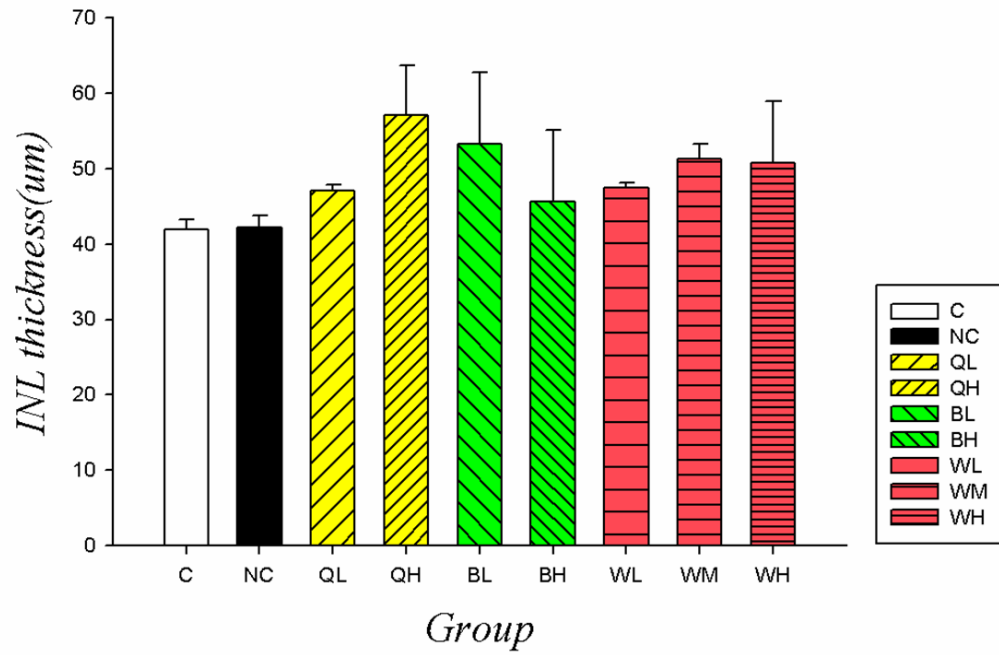
NC: negative control; QL: low dosage of quercetin; QH: high dosage of quercetin; BL: low dosage of betanin; BH: high dosage of betanin; WL: low dosage of water extracts of djulis ; WM: medium dosage of water extracts of djulis ; WH: high dosage of water extracts of djulis; AST: aspartate transaminase; ALT: alanine aminotransferase; BUN: blood urea nitrogen ; CRE: creatinine. $*(p < 0.05)$ compared to the control group by t-test. The different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$. Data are presented by means $\pm$ SD (n=8).

表四 先餵予紅藜水萃取物(WECF)、槲皮素(quercetin)、甜菜鹼(betainin)，再以 LED 誘發小鼠，評估 LED 光誘導小鼠視網膜氧化和抗氧化標誌的影響

Table 4. Effects of water extract of djulis (WECF), quercetin and betanin on lipid oxidation and antioxidant biomarkers in the eyeballs of mice following exposure to LED light

Groups	TBARS (nmol/g)	GSH (mmol/g)	SOD (U/g)
C	207.46±39.01	2.64±0.07	2695.96±143.64
NC	577.26±130.35 ^{*b}	1.95±0.13 ^{*a}	2078.43±163.23 ^{*a}
QL	321.43±65.92 ^{ab}	2.20±0.13 ^{ab}	2207.19±83.27 ^a
QH	295.33±61.59 ^a	2.88±0.52 ^b	2381.49±86.95 ^{abc}
BL	450.56±67.49 ^{ab}	2.38±0.72 ^{ab}	2334.64±117.38 ^{ab}
BH	366.54±51.57 ^{ab}	2.43±0.17 ^{ab}	2372.05±105.42 ^{abc}
WL	374.94±54.67 ^{ab}	1.93±0.09 ^a	2816.69±98.83 ^{cd}
WM	243.16±46.99 ^a	2.60±0.07 ^{ab}	2714.11±179.76 ^{bcd}
WH	240.60±33.31 ^a	2.72±0.36 ^b	2987.79±80.58 ^d

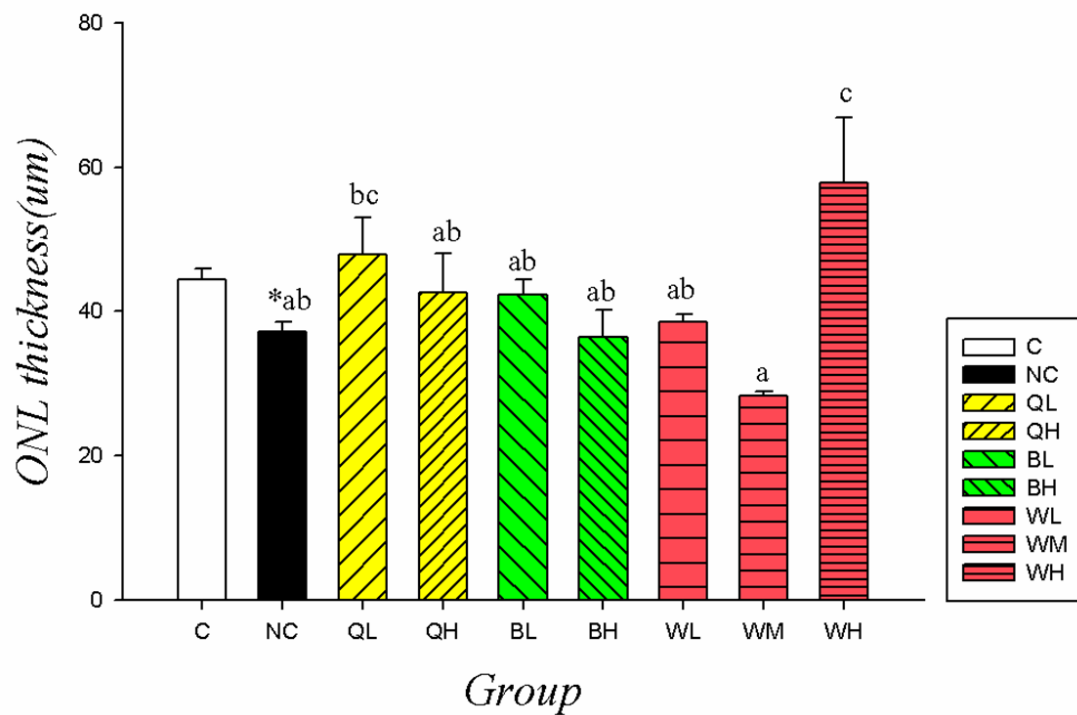
NC: negative control; QL: low dosage of quercetin; QH: high dosage of quercetin; BL: low dosage of betanin; BH: high dosage of betanin; WL: low dosage of water extracts of djulis ; WM: medium dosage of water extracts of djulis ; WH: high dosage of water extracts of djulis; TBARS: thiobarbituric acid substances; GSH: glutathione; SOD: superoxide dismutasealanine. ^{*}($p < 0.05$) compared to the control group by t-test. The different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$. Data are presented by means $\pm$ SD (n=8).



圖二十九、小鼠餵予紅藜水萃取物(WECF)、槲皮素(queracetin)、甜菜鹼(betanin)，再以 LED 照射對視網膜內核層(INL)厚度之影響

Figure 29. Effect of the oral administration of water extract of djulis (WECF), quercetin and betanin on retinal inner nuclear layer (INL) prior to exposure to LED in mice.

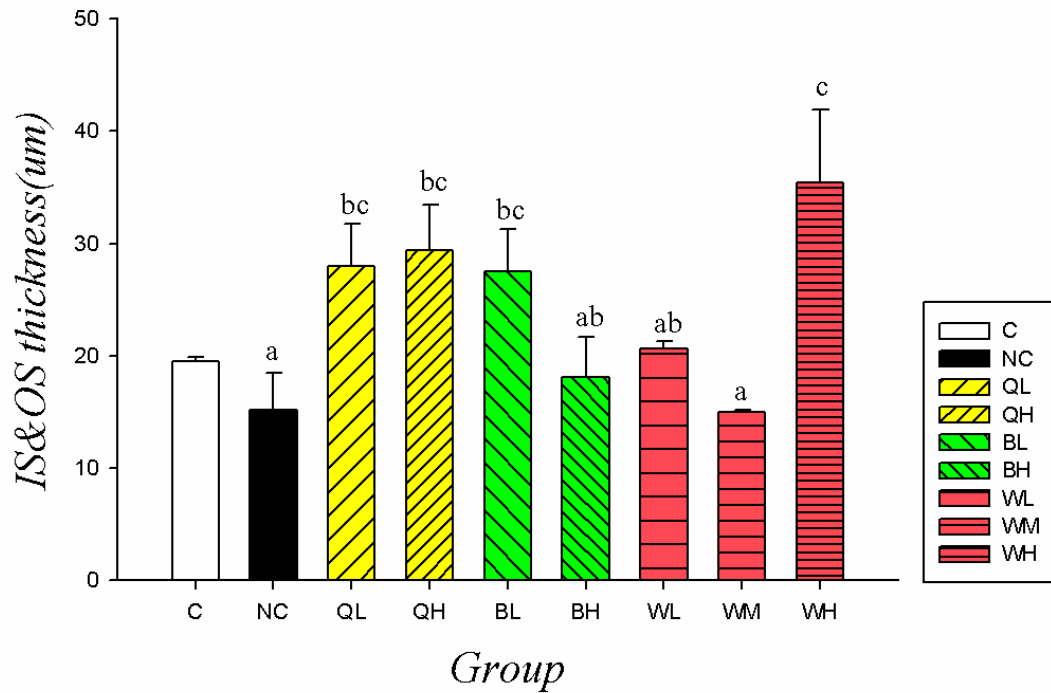
C: Control; NC: Negative control; QL: quercetin at 1 mg/kg bw; QH: quercetin at 10 mg/kg bw; BL: betanin at 1 mg/kg bw; BH: betanin at 10 mg/kg bw; WL: WECF at 10 mg/kg bw; WM: WECF at 50 mg/kg bw; WH: WECF at 100 mg/kg bw. $^{*}(p < 0.05)$ compared to the control group by t-test. Data are presented by means $\pm$ SD (n=8).



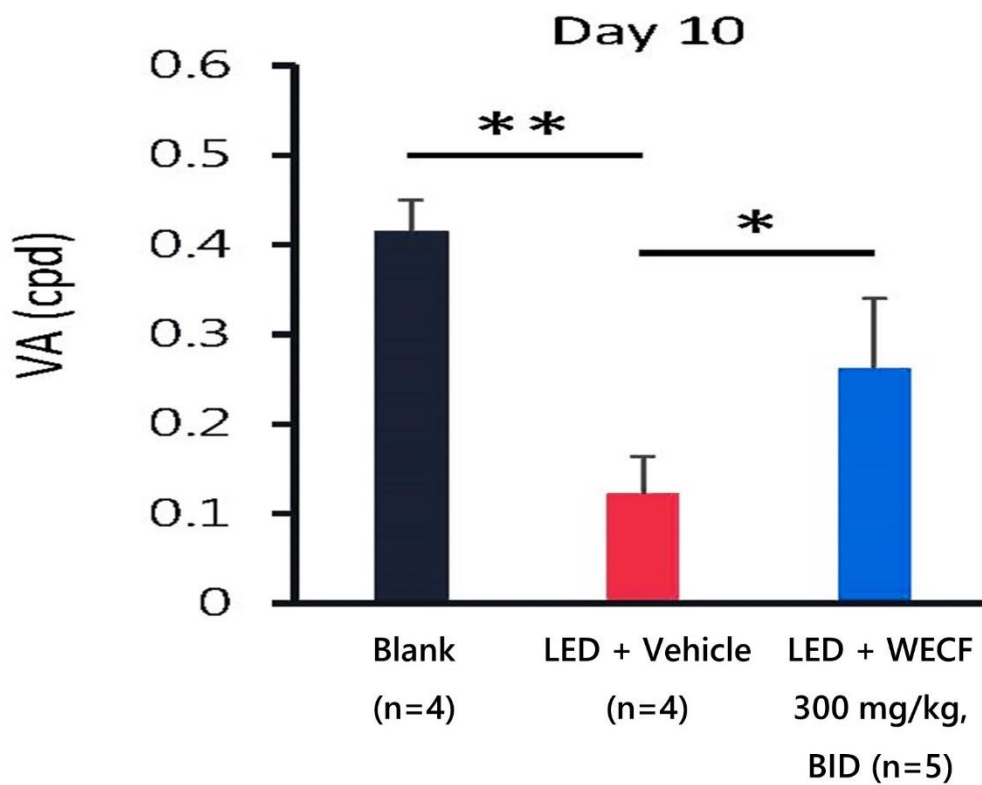
圖三十、小鼠餵予紅藜水萃取物(WECF)、槲皮素(quercetin)、甜菜鹼(betainin)，再以LED照射對視網膜外核層(ONL)厚度的影響

Figure 30. Effect of the oral administration of water extract of djulis (WECF), quercetin and betanin on retinal outer nuclear layer (ONL) prior to exposure to LED in mice.

C: Control; NC: Negative control; QL: quercetin at 1 mg/kg bw; QH: quercetin at 10 mg/kg bw; BL: betanin at 1 mg/kg bw; BH: betanin at 10 mg/kg bw; WL: WECF at 10 mg/kg bw; WM: WECF at 50 mg/kg bw; WH: WECF at 100 mg/kg bw. $^*(p < 0.05)$ compared to the control group by t-test. Data are presented by means $\pm$ SD (n=8).

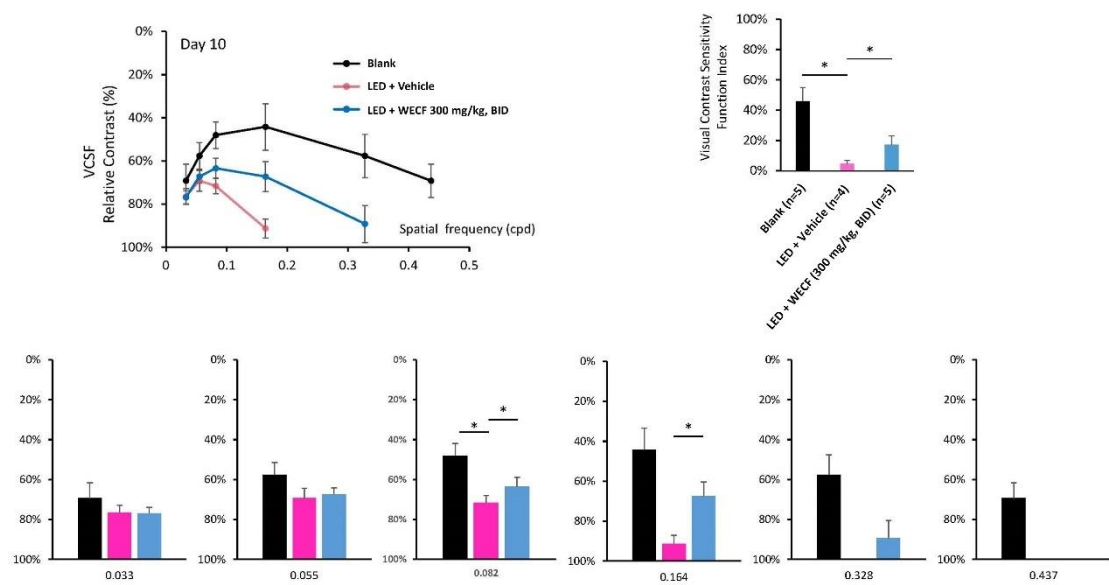


圖三十一、小鼠餵予紅藜水萃取物(WECF)、槲皮素(quercetin)、甜菜鹼(betainin)，再以 LED 照射對網膜感光器內節與外節(inner and outer segments, IS&OS)厚度的影響
 Figure 31. Effect of the oral administration of water extract of djulis (WECF), quercetin and betanin on inner and outer segments (IS&OS) in mice prior to exposure to LED.
 C: Control; NC: Negative control; QL: quercetin at 1 mg/kg bw; QH: quercetin at 10 mg/kg bw; BL: betanin at 1 mg/kg bw; BH: betanin at 10 mg/kg bw; WL: WECF at 10 mg/kg bw; WM: WECF at 50 mg/kg bw; WH: WECF at 100 mg/kg bw. $^{*}(p < 0.05)$ compared to the control group by t-test. Data are presented by means $\pm$ SD (n=8).



圖三十二、小鼠餵予紅藜水萃取物(WECF)，再以LED照射對小鼠視覺敏銳度表現之影響

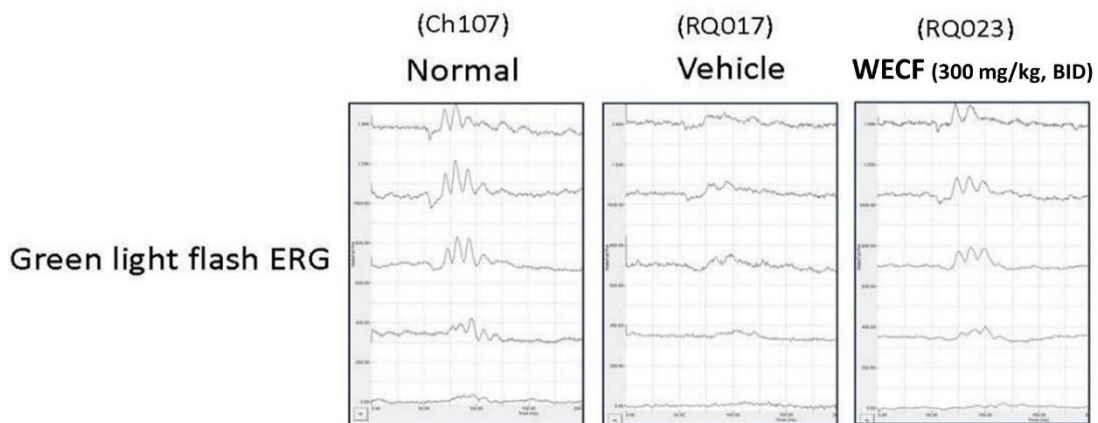
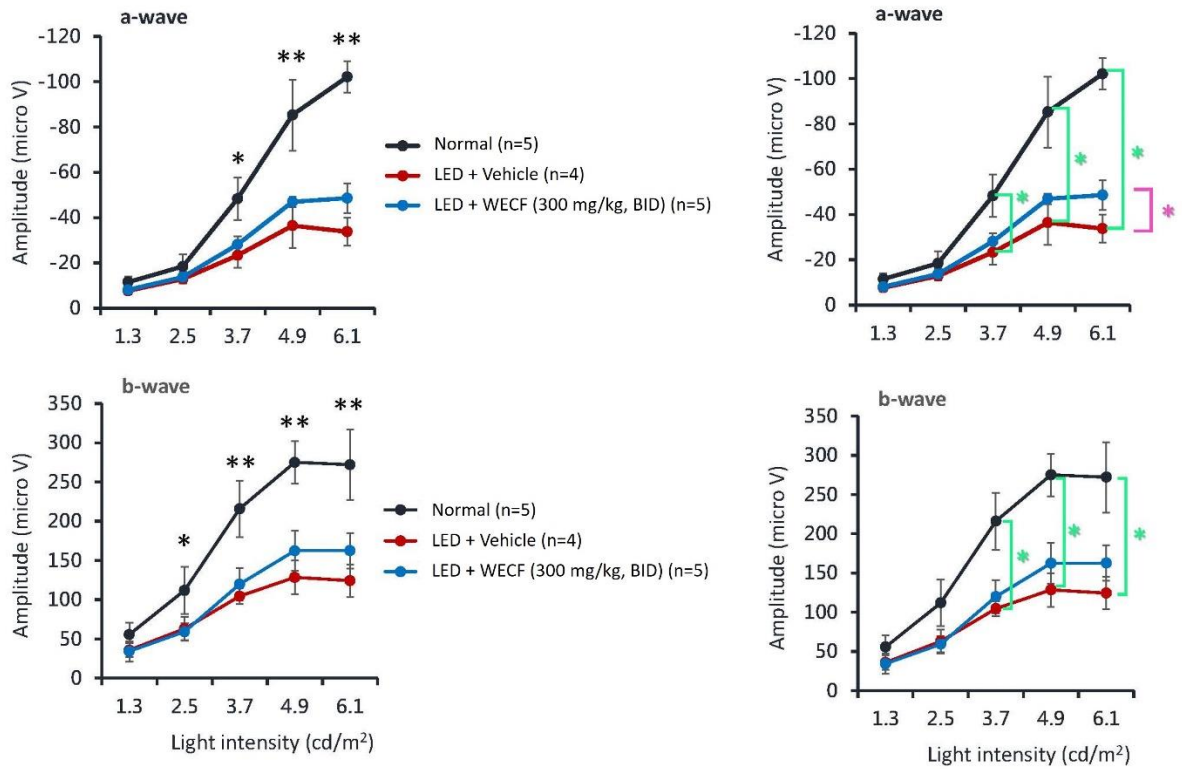
Figure 32. Effect of the oral administration of water extract of djulis (WECF) on visual acuity (VA) in mice prior to exposure to LED. *($p < 0.05$) and **($p < 0.01$) compared by Mann-Whitney U-test.



圖三十三、小鼠餵予紅藜水萃取物(WECF)，再以LED照射對小鼠黑白光柵視覺對比敏感度(WVCS)表現之影響

Figure 33. Effect of the oral administration of water extract of djulis (WECF) on visual contrast sensitivity (VCS) in mice prior to exposure to LED. $^*(p < 0.05)$ compared by Mann-Whitney U-test.

Green light flash ERG



圖三十四、小鼠餵予紅藜水萃取物(WECF)，再以 LED 照射其視網膜電流圖之變化
Figure 34. Effect of the oral administration of water extract of djulis (WECF) on electroretinogram (ERG) in mice prior to exposure to LED. $^*(p < 0.05)$ and $^{**}(p < 0.01)$ compared by Mann-Whitney U-test.

陸、引用文獻

- 衛生福利部統計處(2020)。身心障礙者人數按季，<https://dep.mohw.gov.tw/dos/cp-2976-13815-113.html>。
- 李盼，張羽萱，孫智麗(2016)。全球抗憂鬱及視力保健機能性產品產業分析及發展策略，農業生技產業技刊。
- 蔡碧仁(2006)。民族植物紅藜的永續利用研究-民族植物紅藜之營養及機能性成分之永續利用(1)，行政院農業委員會 95 年度科技計畫研究報告。
- 陳伯易(2016)。田七活性成份之護眼保健功效驗證暨系統性生物評估，科技部補助專題研究計畫成果報告。
- 鄭銀彬(2012)。中草藥複方在光誘導視網膜退化大鼠模式對視力保護之功效評估，嘉南藥理科技大學藥物科技研究所碩士論文。
- 許偉誠 (2007)。不同麻醉方式對犬視網膜電圖之影響及正常犬視網膜電圖之研究，國立中興大學獸醫學系暨研究所碩士論文。
- Blasa, M., Angelino, D., Gennari, L., & Ninfali, P. (2011). The cellular antioxidant activity in red blood cells (CAA-RBC): A new approach to bioavailability and synergy of phytochemicals and botanical extracts. *Food Chemistry*, 125 685–691. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.065>.
- Bungau, S., Abdel-Daim, M.M., Tit, D.M., Ghanem, E., Sato, S., Maruyama-Inoue, M., Yamane, S., & Kadonosono, K. (2019). Health benefits of polyphenols and carotenoids in age-related eye diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Article ID 9783429 | <https://doi.org/10.1155/2019/9783429>
- Chirico, S., Smith, C., Marchant, C., Mitchinson, M., Halliwell, B. (1993). Lipid peroxidation in hyperlipidaemic patients. A study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test. *Free Radical Research Communications*, 19, 51-57.
- Chen, S.Y., Chu, C.C., Chyau, C.C., Fu, Z.H., Duh, P.D. (2018). Effect of water extract of Djulis (*Chenopodium formosanum*) and its bioactive compounds on alcohol-induced liver damage in rats. *International Journal of Food and Nutrition Science*, 5(1), 55-63.
- Chen, S.Y., Chu, C.C., Chyau, C.C., Yang, J.W., Duh, P.D. (2019). The effects of Djulis (*Chenopodium formosanum*) and its bioactive compounds on vasodilation, angiotensin converting enzyme activity, and antihypertension, in vitro and in vivo. *Food Bioscience*, 32, 100469. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100469>
- Chu, C.C., Chen, S.Y., Chyau, C.C., Fu, Z.H., Liu, C.C., Duh, P.D. (2016). Protective effect of Djulis (*Chenopodium formosanum*) and its bioactive compounds protect against carbon tetrachloride-induced liver injury, in vivo. *Journal of Functional Foods*, 26, 585-597.
- Chu, C.C., Chen, S.Y., Chyau, C.C., Wu, Y.C., Chu, H.L., Duh, P.D. (2020). Anticancer activity and mediation of apoptosis in hepatoma carcinoma cells. *Journal of Functional Foods*, 75, 104225.
- Chu, C. C., Chen, S. Y., Chyau, C. C., Wang, S. C., Chu, H. L., & Duh, P. D. (2022). Djulis (*Chenopodium formosanum*) and Its Bioactive Compounds Protect Human Lung Epithelial A549 Cells from Oxidative Injury Induced by Particulate Matter via Nrf2 Signaling Pathway. *Molecules*, 27, 253. <https://doi.org/10.3390/molecules27010253>
- Chyau, C.C., Chu, C.C., Chen, S.Y., Duh, P.D. (2015). Djulis (*Chenopodium formosanum*) and its bioactive compounds protect against oxidative stress in human HepG2 cells. *Journal of Functional Foods*, 18, 159-170.
- Chyau, C.C., Chu, C.C., Chen, S.Y., Duh, P.D. (2018). The inhibitory effects of Djulis (*Chenopodium formosanum*) and its bioactive compounds on adipogenesis in 3T3-

- L1 adipocytes. *Molecules*, 23, 1780; doi:10.3390.
- Duh, P. D., Chen, Z. T., Lee, S. W., Lin, T. P., Wang, Y. T., Yen, W. J.....Chu, H. L. (2012). Antiproliferative activity and apoptosis induction of Eucalyptus citriodora resin and its major bioactive compound in melanoma B16F10 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7866–7872. [http://refhub.elsevier.com/S1756-4646\(15\)00319-9/sr0050](http://refhub.elsevier.com/S1756-4646(15)00319-9/sr0050).
- Escribano, J., Cabanes, J., Jiménez-Atiénzar, M., Ibañez-Tremolada, M., Gómez-Pando, L.R., García-Carmona, F., Gandía-Herrero, F. (2017). Characterization of betalains, saponins and antioxidant power indifferently colored quinoa (*Chenopodium quinoa*) varieties, *Food Chemistry*, 234, 285-297.
- Frobose I. (2023). *Der Stoffwechsel-Kompass. 新陳代謝，所有你必須知道的事。* 黃淑欣 譯 城邦文化事業股份有限公司出版
- Hong, Y.H., Huang, Y.L., Liu, Y.C., Tsai, P.J. (2016). Djulis (*Chenopodium formosanum* Koidz.) water extract and its bioactive components ameliorate dermal damage in UVB-irradiated skin models. *BioMed Research International*, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7368797>.
- Kuse, Y., Ogawa, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hara, H. (2014). Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by lightemitting diode-derived blue light. *Scientific Reports*, 4.
- Lingappan, K. (2018). NF-κB in Oxidative Stress. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 81-86. <https://doi.org/10.1016%2Fj.cotox.2017.11.002>.
- Müller, P.L., Odainic, A., Treis, T., Herrmann, P., Tufail, A., Holz, F.G., Maximilian Pfau, M. (2021). Inferred retinal sensitivity in recessive Stargardt disease using machine learning. *Scientific Reports*, 2021; 11: 1466. <http://doi: 10.1038/s41598-020-80766-4>
- Suárez-Barrio, C., Olmo-Aguado, S., García-Pérez, E., Fuente, M., Muruzabal, F., Anitua, E., Merayo-Llodes, J. (2020). Antioxidant Role of PRGF on RPE Cells after Blue Light Insult as a Therapy for Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1021; doi:10.3390/ijms21031021.
- Taylor, C.A., Zheng, Q., Liu, Z., Thompson, J.E. (2013). Role of p38 and JNK MAPK signaling pathways and tumor suppressor p53 on induction of apoptosis in response to Ad-eIF5A1 in A549 lung cancer cells. *Molecular Cancer*, 12, 35. <http://www.molecular-cancer.com/content/12/1/35>
- Wang, Y., Li, C., Li, J., Wang, G., & Li, L. (2020). Non-esterified Fatty Acid-Induced Reactive Oxygen Species Mediated Granulosa Cells Apoptosis Is Regulated by Nrf2/p53 Signaling Pathway. *Antioxidants*, 9(6), 523. <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/6/523>.
- Wang, H., & Joseph, J. A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 612-616.
- Wu, M.J., Huang, C.J., Lian, T., Kou, M.C., Wang, L. (2005). Antioxidant activity of *Glossogyne tenuifolia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6305-6312.
- Xiong, W., Li, Y., Yao, Y., Xu, Q., & Wang, L. (2022). Antioxidant mechanism of a newly found phenolic compound from adlay (NDPS) in HepG2 cells via Nrf2 signalling. *Food Chemistry*, 378, 132034. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.132034>.

柒、附錄

附件二

科技部補助專題研究計畫成果自評表

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(簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現)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(請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊)

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 200 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)。

國人接觸電子螢幕時間過長，尤其近年來 3C 產品充斥、螢幕鮮豔、亮度太高、使用時間過長等因素導致容易傷眼。因此，預防眼睛疾病乃為當務之急。其中藉由發掘天然活性物質以保護眼睛，是近年來的研究重點。現今有些廠商已關注到市場需求，惟受限於人力及研發等因素，有科學數據的相關護眼產品並不多。有鑑於此，探討護眼效應之研究有其意義性。綜合本計畫二年之 *in vitro* 與 *in vivo* 試驗結果，證實紅藜水萃取物與其活性成分對 LED 光源誘發視網膜光氧化傷害有保護效應。

目前坊間護眼之保健成分以葉黃素與玉米黃質為主，若能搭配本研發成果，深信對護眼效益必有其意義性。再者，紅藜與其活性成分先前已由本人所執行多項計畫證實具有多方面之生物功能，如今再證實紅藜與其活性成分亦賦予護眼特性。換言之，紅藜具有多樣之生物功能，極具有開發價值。爰此，本研發成果可作為業界開發保健食品之參考，尤其針對過度使用 LED 光源造成傷害之機能素材更具有其市場競爭力。另外，本研發成果在輔助醫療上有其應用潛力，在學術上亦可應用在教學與研究。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： ☐ 否 ☒ 是，建議提供機關 經濟部、農委會、衛福部

(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

說明：(以 150 字為限)

附件四

科技部補助專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：杜平惠					計畫編號：MOST 110－2320－B－041－001－MY2				
計畫名稱：紅藜與其活性成分對 LED 光源誘發視網膜傷害之保護效應									
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					篇	請附期刊資訊。	
		研討會論文							
		專書					本	請附專書資訊。	
		專書論文					章	請附專書論文資訊。	
		技術報告					篇		
		其他					篇		
	智慧財產	專	發明	申請中			件	請附佐證資料，如申請案號。	

	產 權 及 成 果	利 權	專 利	已 獲 得			請附佐證資料，如獲證案號。
			新 型 / 設 計 專 利				
		商 標 權					
		營 業 秘 密					
		積 體 電 路 電 路 布 局 權					
		著 作 權					
		品 種 權					
		其 他					
		技 術 移 轉	件 數				
	收 入				千 元	1. 依「科技部科學技術研究發展成果歸屬及運用辦法」第 2 條規定，研發成果收入係指執行研究發展之單位因管理及運用研發成果所獲得之授權金、權利金、獎金、股權或其他權益。 2. 請註明合約金額。	
國 外	學 術 性 論 文	期刊論文		1	篇	Liu, C.C., Chu, C.C., Chen, S.Y., Lin, Y.C., Duh, P.D.* Attenuation of blue light-induced photo-oxidative stress through inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathways, and activation of Nrf2 signaling pathway by djulis and its bioactive compounds. Journal of Functional Foods 109 (2023) 105797 https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105797 本 論 文 發 表 於 Journal of Functional Foods ，網址如上。 整體而言，紅藜及其生物活性化合物具有保護 ARPE-19 細胞免受 BL 誘導的視網膜損傷的潛力，此研究結果對視網膜疾病的治療有參考價值。	
		研討會論文		1		Duh, P.D., Liu, C.C., Chu, C.C., Chen, S.Y. Djulis and its bioactive compounds suppress blue light-induced retinal damage by inhibiting NF- κ B and MAPK and activating Nrf2 signaling pathway. The 31st International Conference on Photochemistry. Japan, Sapporo, 2023.7.23-28.	
		專 書			本	請附專書資訊。	
		專 書 論 文			章	請附專書論文資訊。	

		技術報告				篇		
		其他				篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中		件	請附佐證資料，如申請案號。	
已獲得					請附佐證資料，如獲證案號。			
新型/設計專利								
		商標權						
		營業秘密						
		積體電路電路布局權						
		著作權						
		品種權						
		其他						
	技術移轉	件數				件		
收入				千元	1. 依「科技部科學技術研究發展成果歸屬及運用辦法」第 2 條規定，研發成果收入係指執行研究發展之單位因管理及運用研發成果所獲得之授權金、權利金、價金、股權或其他權益。 2. 請註明合約金額。			
參與計畫人力	本國籍	大專生				人次		
		碩士生			1		嘉南藥理大學保健營養系碩士班研究生黃紹程執行大部分動物實驗	
		博士生						
		博士後研究員						
		專任助理			1		陳潔芸專任助理，其協助實驗之執行，數據整理，後續行政支援。	
	非本國籍	大專生						
		碩士生						
		博士生						
		博士後研究員						
		專任助理						
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。)				敝人連續三年入榜史丹佛大學調查 2021-2023 年全球前 2% 頂尖科學家行列，榜單如超連結所示： 2021: 榜單連結 2022: 榜單連結 2023: 榜單連結				

行政院科技部補助國內專家學者出席國際學術會議報告

2023 年 8 月 10 日

報告人姓名	杜平惠	服務機構	嘉南藥理大學 食品科技系	職稱	教授
時間 會議地點	2023/7/23-28 日本札幌	本會核定 補助文號	MOST 110－2320－B－041－001－MY2		
會議 名稱	(中文) 第 31 屆光化學國際研討會 (英文) The 31st International Conference on Photochemistry				
發表 論文 題目	(中文) 紅藜與其活性成分對藍光誘發視網膜傷害之保護效應 (英文) The protective effect of djulis and its bioactive compounds against blue light-induced retina damage				

一、參加會議經過

第 31 屆光化學國際研討會(The 31st International Conference on Photochemistry)自 2023,7,23~2023,7,28 於日本北海道札幌市的 Sapporo Park Hotel 舉行。因新冠病毒疫情，睽違三年的 ICP 於今年恢復舉行。這也是 1962 年第一屆 ICP 於比利時布魯塞爾舉行，而後於 1965 年與 2003 年分別於東京與奈良舉辦後，經過 20 年再次回到日本舉行，再者，因疫情結束，使得本次會議參加人數顯得比往年要熱絡多。

本次會議主題範圍涵蓋如下：

1. Fundamental Photochemistry and Photophysics (基礎光化學和光物理學)
2. New Frontier in Ultrafast Photochemistry (Ultrafast Electronic and Structural Dynamics using atto- and/or femto-second lasers, SR beam, XFEL etc.)(超快速光化學的新前沿 (使用阿秒和/或飛秒激光、同步輻射束、X 光自由電子激光等進行超快速電子和結構動態研究))
3. Photochemistry Using Nano- or Micro-structures (Plasmon, Metasurface, Microcavity etc.)(使用納米或微結構的光化學 (等離子體、超表面、微腔等))
4. Photochemistry for Biology and Medicine (Natural Photosynthesis, Photoimmunotherapy etc.)(生物與醫學的光化學 (自然光合作用、光免疫療法等))
5. Photochemistry towards Carbon Neutral (Solar Fuel, Solar Cell, Artificial Photosynthesis etc.)(通往碳中和的光化學 (太陽能燃料、太陽能電池、人工光合作用等))
6. Photocatalytic Reaction (Photocatalysis for Environment and/or Organic Synthesis, Photoredox Catalyst etc.)(光催化反應 (環境和/或有機合成的光催化、光氧化還原催化等))
7. Spectroscopy of Single Molecules, and Nanostructures, and Small Domains(單分子、納米結構和小域的光譜學)
8. New Concepts and Methods in Theoretical Photochemistry(理論光化學的新概念和方法)
9. Photochemistry for Photonic Devices and Biophotonics (OLED, Photonic Materials for Display, Advanced Luminescent Materials, Photochromic Materials, Bioimaging and Its

Methodology, etc.)(光化學應用於光子器件和生物光子學 (有機發光二極體、顯示器用光子材料、先進發光材料、光致變色材料、生物影像及其方法等)。

大會共安排 12 場 plenary speakers 與 12 場 keynote speakers，彼等皆為相關領域特別傑出學者或專家。另外，大會安排 200 口頭論文演講及 278 篇壁報參展論文。計有大約數十個國家學者與業界代表參加。人數多，且參展之論文品質也不差。

二、與會心得

大會於 23 日下午 4 點開幕，今年參與人數頗多，約有 600 人左右，整個會場幾乎座無虛席。今年主辦國由當地主席 Hirashi Masuhara 致詞後正式開始。首先，大會安排兩場紀念講座分別為 Prof. Ikuzo Tanaka Memorial Lecture，由來自中華民國陽交大李遠鵬教授報告，題目為:Spectra and Reactions of Criegee intermediates (Criegee 中間體的光譜和反應)，Criegee 中間體是一種在氣相中形成的高能量短暫化學物種，李教授演講內容圍繞此短暫化學物種之光譜和反應作用。另一紀念講座 Prof. Saburo Nagakura Memorial Lecture，由法國學者 Thomas W. Ebbesen (Univ. of Strasbourg)演講 Hybrid Light-Matter States and their Impact on Chemical Properties(光-物質態混合及其對化學性質的影響)。聽眾中也提出一些問題，彼此交流。隨後於 6 點 20 分左右團體合影，並舉辦歡迎會。席間與會者交談熱絡，氣氛良好。

今年共有九大主題，分別於 ABCD 四個廳中舉行口頭論文演講與 A 廳壁報論文展示。綜觀所有論文內容與筆者研究範圍較相近者為 Photochemistry for Biology and Medicine。筆者從事機能性食品研究多年，惟對植化素保護因光照射引起視網膜傷害之研究仍屬於入門階段，因此抱著學習、蒐集資料態度參加此次會議。由於各個主題以光化學為主，因此筆者盡可能接觸，進而瞭解個中內容心態與會，惟專業研究領域有別，吸收程度自有限。

整體而言，來自世界各地在光電化學各領域之專家與學者參加此盛會，彼等在口頭與壁報論文上闡述自己研發成果，而與會者也提出本身己見，各會場充滿學術與實務討論氣氛。筆者初估來自台灣學者與專家(包含筆者)約有 23 位。筆者此次所提的論文題目為:紅藜與其活性成分對藍光誘發視網膜傷害之保護效應(The protective effect of djulis and its bioactive compounds against blue light-induced retina damage)。壁報論文展示期分兩天共四個場次，筆者壁報論文被安排於 26 日下午 5:00-6:30，與會者駐足閱讀。

此次大會位置在地鐵站旁的 Sapporo Park hotel，地點方便，口頭論文與壁報論文地點動線通暢、各項服務到位，因此留下來閱覽壁報論文者眾，筆者對大會如此實務性安排，給予讚美，惟對於會議期間未準備午餐，造成與會者不便，可說美中不足之處。

六天大會期間，筆者除聆聽多場口頭論文報告及壁報論文，另外，於休息及 reception party 時間和與會學者互相認識。期盼這些交流對筆者能累積更多知識，以利更加充實與拓展學術專業領域。

三、發表論文摘要

The protective effect of djulis and its bioactive compounds against blue light-induced retina damage

Pin-Der Duh¹, Ching-Chih Liu², Chin-Chen Chu³, Shih-Ying Chen⁴

¹*Department of Food Science and Technology, Chia Nan University of Pharmacy and Science, 60 Erh-Jen Road, Section 1, Pao-An, Jen-Te District, Tainan, 71710, Taiwan, R.O.C.*

²*Department of Ophthalmology Chi-Mei Medical Center, 710402, Taiwan, R.O.C.*

³*Department of Anesthesiology, Chi-Mei Medical Center, 710402, Taiwan, R.O.C.*

⁴*Department of Health and Nutrition, Chia Nan University of Pharmacy and Science, Taiwan, R.O.C.*

E-mail: ipdduh@mail.cnu.edu.tw

The aim of this study is to investigate the djulis (*Chenopodium formosanum*) and its bioactive compounds inhibit blue light-induced retinal damage in retinal pigment epithelium (RPE) cells, and to elucidate the mechanism action. The results showed that water extract of djulis (WECF) in the range from 0.1 to 25 µg/mL did not affect AREP-19 cells viability. The cell viability was 55.8% when cells were treated with blue light with short wavelengths (410-480 nm) exposure for 6 h and then incubated for 18 h, indicating that blue light significantly decreased cell viability. However, treatment of AREP-19 cells with WECF at 25 µg/mL, the cell viability was up to 85%, compared to the cells treated with blue light alone, implying that WECF protected cells against blue light-induced cytotoxicity. WECF-inhibited cytotoxicity by blue light was associated with decrease in blue light-induced reactive oxygen species (ROS) generation, thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) formation and activity of caspase-3, and increase in glutathione (GSH) levels, mitochondrial membrane potential (MMP), and SOD activity. Furthermore, WECF protected AREP-19 cells from blue light-induced photo-oxidative stress injury by inhibiting the activation of the JNK, ERK and p38 signaling pathways. Moreover, WECF was capable of combating oxidative stress by enhancing the protein levels of heme oxygenase 1 (HO-1), by upregulating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)-mediated pathway in blue light-induced AREP-19 cells. In addition, betanin, kaempferol, quercetin and rutin, presented in WECF, at 1-10 µM inhibited ROS generation and TBARS formation, and significantly restored GSH levels, increased SOD activity and HO-1 protein levels in blue light-induced AREP-19 cells, compared to the cells treated with blue light alone. Taken together, WECF showed a significantly cytoprotective effect against blue light-induced photo-oxidative damage of AREP-19 cells, which may be most likely because of inhibition of photo-oxidative stress, regulation of the MAPK pathway

and modulation of the antioxidant pathway in blue light-induced AREP-19 cells as well as the bioactive compounds presented in WECF. These findings provide insights into the protective effect of djulis and its bioactive compounds against blue light-induced retina damage, which could potentially be useful for treating retinal disease.

.

Funding: Ministry of Science and Technology of the Republic of China, grant number (MOST 110-2320-B-041-001MY2).

Acknowledgement: This research work was supported by research grants from the Ministry of Science and Technology of the Republic of China.

四、攜回資料名稱及內容

此次會議攜回第 31 屆光化學國際研討會會議論文集乙冊，可讓有興趣者參閱。

110年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：杜平惠			計畫編號：110-2320-B-041-001-MY2		
計畫名稱：紅藜與其活性成分對LED光源誘發視網膜傷害之保護效應					
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	
		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	
國外	學術性論文	期刊論文	1	篇	Liu, C.C., Chu, C.C., Chen, S.Y., Lin, Y.C., Duh, P.D.* Attenuation of blue light-induced photo-oxidative stress through inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathways, and activation of Nrf2 signaling pathway by djulis and its bioactive compounds. Journal of Functional Foods 109 (2023) 105797 https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105797 本論文發表於Iournal of Functional Foods，網址如上。 整體而言，紅藜及其生物活性化合物具有保護ARPE-19細胞免受BL誘導的視網膜損傷的潛力，此研究結果對視網膜疾病的治療有參考價值。
		研討會論文	1		Duh, P.D., Liu, C.C., Chu, C.C., Chen, S.Y. Djulis and its bioactive compounds suppress blue light-induced retinal damage by inhibiting NF- κ B and MAPK and activating Nrf2 signaling pathway. The 31st International Conference on Photochemistry. Japan, Sapporo, 2023. 7. 23-28.
		專書	0	本	
		專書論文	0	章	
		技術報告	0	篇	
		其他	0	篇	
參與計	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	1		嘉南藥理大學保健營養系碩士班研究生黃紹程執行大部分動物實驗

畫 人 力		博士生	0	陳潔芸專任助理，其協助實驗之執行，數據整理，後續行政支援。
		博士級研究人員	0	
		專任人員	0	
	非本國籍	大專生	1	
		碩士生	0	
		博士生	0	
		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。)	敝人連續三年入榜史丹佛大學調查2021-2023 年全球前2% 頂尖科學家行列，榜單如超連結所示： 2021:榜單連結https://www.elsevier.com/zh-tw/solutions/scopus/Worlds-Top-2-percent-Scientists-2021-Taiwan 2022:榜單連結https://www.elsevier.com/zh-tw/solutions/scopus/Worlds-Top-2-percent-Scientists-2022-Taiwan 2023:榜單連結 https://elsevier.digitalcommonsdata.com/datasets/btchxktzyw/6
--	--