

國家科學及技術委員會補助專題研究計畫報告

LED導致視網膜損傷的性別差異化探討：聚焦於視網膜色素上皮及感光細胞的研究

報告類別：成果報告
計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 110-2629-B-040-001-
執行期間：110年08月01日至111年07月31日
執行單位：中山醫學大學營養學系（所）

計畫主持人：張菡馨

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：王詩蓉
博士班研究生-兼任助理：張閔淳

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 111 年 10 月 30 日

中文摘要：短波長的光對視網膜有害，而感光細胞死亡是視網膜退化的主要特徵。雖然目前已有許多關於強光及視網膜的相關實驗，然而要將這些研究進行比較並統整出結論是相當困難的，有許多因子會對實驗結果造成干擾，例如環境因素、光裝置的來源及設置或動物品系與性別間的差異。因此為了確實比較短期和長期光照後視網膜的形態變化，本實驗將C57BL/6小鼠曝露於市售LED燈，並使用不同性別和兩種不同週齡的實驗動物（8週齡和36週齡），且分別使用於兩種不同LED燈光曝條件（1000 lux照射45天、4500lux照射7天）。檢測 rhodopsin、opsin-1、ZO-1、N-Cadherin、Iba-1、PAX6、GFAP和PCNA蛋白於視網膜組織中表現量或細胞型態的變化。本實驗觀察到，較低強度但長時間LED曝露會導致錐狀細胞嚴重退化，並破壞感光細胞和Müller cell之間的tight junctions和adherens junctions。此外，在1000 lux、長時間LED光照組中也檢測到活化的microglia和Müller cell。更甚的是，和相同光照條件下、與年齡/性別匹配的小鼠相比，雌性及老年小鼠的視網膜退化的病程進展更為快速。因此由本實驗可得知，不同條件的LED光照條件會導致視網膜損傷的起始位置不同，由柱狀細胞開始或由錐狀細胞開始的損傷會引發後續視網膜退化的疾病進展和訊息途徑不同。

中文關鍵詞：視網膜、感光細胞、LED、神經膠質細胞

英文摘要：Short wavelengths of light are harmful to the retina, and photoreceptor cell death is a major feature of retinal degeneration. Although many experiments investigated the detrimental effect of glare on retina, it still has been difficult to draw conclusions due to many interfering factors, such as environmental circumstances, the source and setting of light emission, and/or and the differences between animal strains and sex. To study the morphological changes of the retina after short-term and long-term illumination, C57BL/6 mice with both genders and different ages (8 weeks and 36 weeks) were exposed to commercially available LED lights (1000 lux irradiation for 45 days, 4500 lux irradiation for 7 days). Cell morphology was examined by histological analysis and the changes of rhodopsin, opsin-1, ZO-1, N-Cadherin, Iba-1, PAX6, GFAP and PCNA proteins in retinal tissue were also studied by immunohistochemistry. The results demonstrated that lower-intensity but prolonged LED exposure caused severe degeneration of cone cells and disruption of tight junctions and adherent junctions between photoreceptor cells and Müller cells. In addition, activated microglia and Müller cells were also detected in the 1000 lux, long-term LED illumination group. Furthermore, the course of retinal degeneration progressed more rapidly in female and older mice than in age/sex-matched mice under the same light conditions. Therefore, it can be known from this experiment that different LED lighting conditions will lead

to different starting locations of retinal damage, and damage starting from columnar cells or starting from cone cells will lead to different disease progression and pathways of subsequent retinal degeneration.

英文關鍵詞：Retina, Photoreceptors, LED, Glial cells

國家科學及技術委員會補助專題研究計畫報告

不同 LED 光照條件所導致視網膜損傷差異化探討：

聚焦於感光細胞的研究

報告類別：進度報告

成果報告：完整報告/精簡報告

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSTC 110—2629—B—040—001—

執行期間：110 年 08 月 01 日至 111 年 07 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學營養學系(所)

計畫主持人：張菡馨

共同主持人：

計畫參與人員：張閔淳、王詩蓉

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

出國參訪及考察心得報告

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關_____

(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 111 年 10 月 31 日

中文摘要

短波長的光對視網膜有害，而感光細胞死亡是視網膜退化的主要特徵。雖然目前已有許多關於強光及視網膜的相關實驗，然而要將這些研究進行比較並統整出結論是相當困難的，有許多因子會對實驗結果造成干擾，例如環境因素、光裝置的來源及設置或動物品系與性別間的差異。因此為了確實比較短期和長期光照後視網膜的形態變化，本實驗將 C57BL/6 小鼠曝露於市售 LED 燈，並使用不同性別和兩種不同週齡的實驗動物（8 週齡和 36 週齡），且分別使用於兩種不同 LED 燈光曝條件（1000 lux 照射 45 天、4500lux 照射 7 天）。檢測 rhodopsin、opsin-1、ZO-1、N-Cadherin、Iba-1、PAX6、GFAP 和 PCNA 蛋白於視網膜組織中表現量或細胞型態的變化。本實驗觀察到，較低強度但長時間 LED 曝露會導致錐狀細胞嚴重退化，並破壞感光細胞和 Müller cell 之間的 tight junctions 和 adherens junctions。此外，在 1000 lux、長時間 LED 光照組中也檢測到活化的 microglia 和 Müller cell。更甚的是，和相同光照條件下、與年齡/性別匹配的小鼠相比，雌性及老年小鼠的視網膜退化的病程進展更為快速。因此由本實驗可得知，不同條件的 LED 光照條件會導致視網膜損傷的起始位置不同，由柱狀細胞開始或由錐狀細胞開始的損傷會引發後續視網膜退化的疾病進展和訊息途徑不同。

關鍵詞: 視網膜、感光細胞、LED、神經膠質細胞

Abstract

Short wavelengths of light are harmful to the retina, and photoreceptor cell death is a major feature of retinal degeneration. Although many experiments investigated the detrimental effect of glare on retina, it still has been difficult to draw conclusions due to many interfering factors, such as environmental circumstances, the source and setting of light emission, and/or and the differences between animal strains and sex. To study the morphological changes of the retina after short-term and long-term illumination, C57BL/6 mice with both genders and different ages (8 weeks and 36 weeks) were exposed to commercially available LED lights (1000 lux irradiation for 45 days, 4500 lux irradiation for 7 days). Cell morphology was examined by histological analysis and the changes of rhodopsin, opsin-1, ZO-1, N-Cadherin, Iba-1, PAX6, GFAP and PCNA proteins in retinal tissue were also studied by immunohistochemistry. The results demonstrated that lower-intensity but prolonged LED exposure caused severe degeneration of cone cells and disruption of tight junctions and adherent junctions between photoreceptor cells and Müller cells. In addition, activated microglia and Müller cells were also detected in the 1000 lux, long-term LED illumination group. Furthermore, the course of retinal degeneration progressed more rapidly in female and older mice than in age/sex-matched mice under the same light conditions. Therefore, it can be known from this experiment that different LED lighting conditions will lead to different starting locations of retinal damage, and damage starting from columnar cells or starting from cone cells will lead to different disease progression and pathways of subsequent retinal degeneration.

Keywords: Retina, Photoreceptors, LED, Glial cells

報告內容

報告內容

前言及研究目的

全球約有 2 億 8000 萬人口患有中度或重度的視覺問題以及失明的問題，而在這些視覺受損的患者中，有 65% 視力受損的患者及 82% 的失明人口，其年齡範圍為 50 歲以上，此外，在綜合分析中，更得到女性失明人口占總失明人口的比例高達三分之二[1]，顯示出性別及年齡是影響視覺功能的高風險因子；近年來越來越多研究指出，雌激素在視網膜的健康維持上扮演重要角色，且不同性別間視網膜的結構是存在差異的，因此本計畫將著重探討在不同性別的狀況下，是否會造成視網膜受光線傷害時，男性和女性視網膜的結構及功能的變化也有所差異。

過去視網膜相關實驗中，經常僅針對單一性別的動物進行觀察，或是在臨床研究中並沒有將性別差異列入考量，造成實驗結果所反應的僅為某一性別的病理特徵，而在本計畫中預計觀察在停經前的母鼠和同年齡之公鼠相比，是否會因雌激素的保護作用，而造成停經前的母鼠其視網膜受光傷害的損傷程度較低？

同樣年齡的健康動物或人體中，女性的視網膜結構和男性相比是比較薄的，並且視網膜中感光細胞數量、以及 ERG 的振幅在女性的視網膜中也都低於男性；然而目前的研究結果普遍認為，雌激素因為具有抗氧化效果而對視網膜具保護效果，因此本計畫期望知道，在女性視網膜功能、結構先天差於男性的前提之下，是否有機會透過雌激素的作用，彌補女性視網膜的先天不足，使強光刺激的狀況下，女性視網膜的受損程度比男性低。

雌激素的抗氧化能力有助於視網膜健康的維持，因此在本計畫中預計觀察停經後的母鼠，是否會因為雌激素的不足而使視網膜所受的光傷害比停經前的母鼠來得重？以及和同週齡的公鼠相比，母鼠確實會因雌激素不足而使視網膜光傷害加劇？

大多數的研究都認為雌激素對視網膜具有保護作用，並且觀察到卵巢移除或停經後母鼠確實在視網膜的結構及功能和雌激素分泌充足的個體相比明顯衰退，然而目前現有的研究並沒有比較停經前、後的母鼠，在接收同樣條件的光現刺激後，其視網膜受損的程度或是視網膜中主要受損的細胞是否也會有所差異？

男性和女性的視網膜結構原本就存在先天上的差異，而從本計畫中我們期望透過組織學的方式，比較同樣年齡的公鼠和母鼠受光照傷害時，會不會因視網膜上賀爾蒙接受器的數量、或賀爾蒙濃度的不同，而造成視網膜中細胞受損的主要位置也有所不同。

有鑑於現代人使用 3C 產品的頻率及使用時間大幅增加，在本計畫中我們利用長時間但低強度的光線暴露模擬現代人的用眼習慣，並比較此方式的光刺激傷害和短時間高強度的光刺激相比，何者對視網膜造成的傷害會更嚴重，此外透過此計畫也將可比較不同性別及年齡層的動物所受視網膜損傷的程

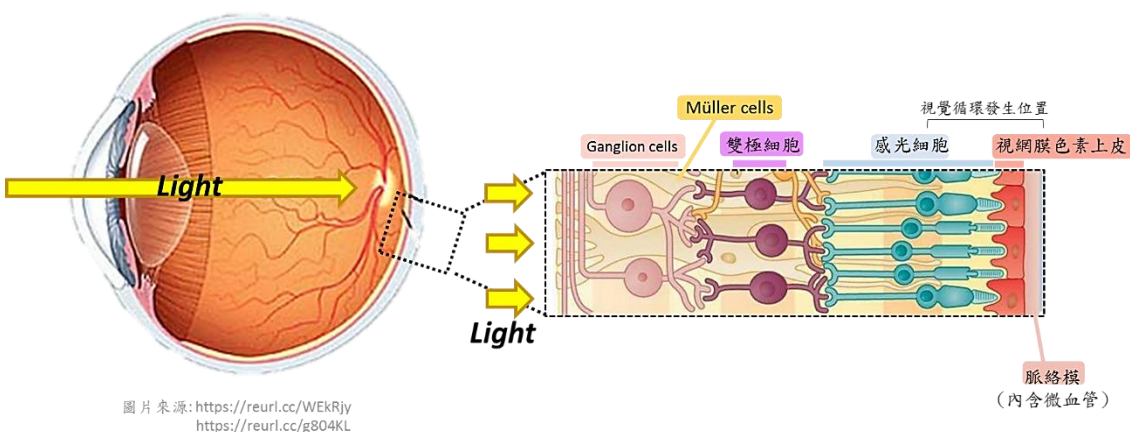
度、及細胞型態是否不同，並釐清視網膜傷害的差異是否會受賀爾蒙濃度不同所影響。

文獻探討

視網膜的結構及視網膜色素上皮、感光細胞的主要功能

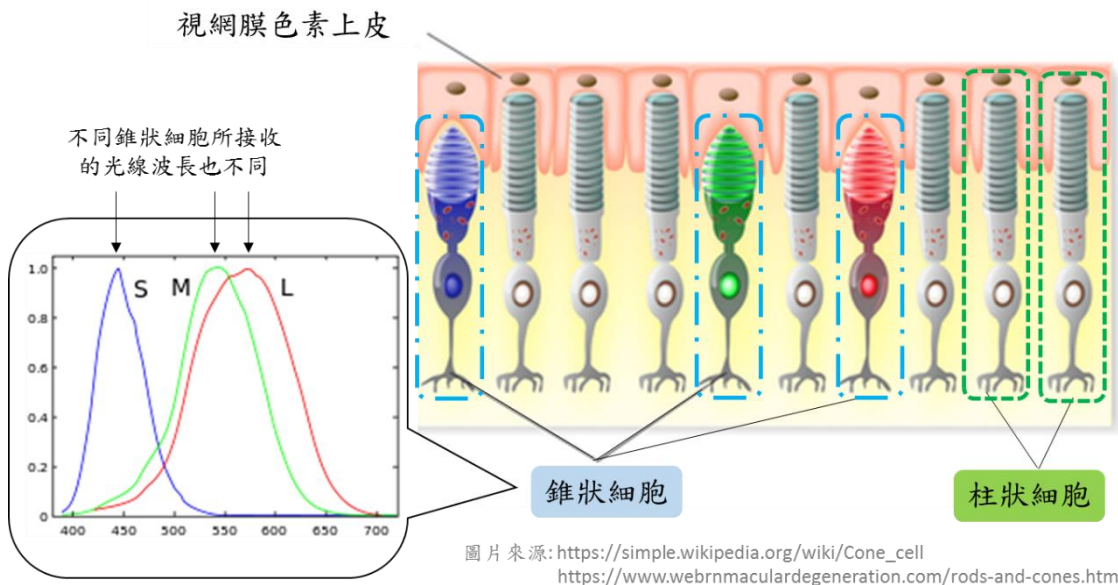
視網膜位於眼球的後半部，其功能之一是將眼睛所接收到的光線轉換成電位訊號，並透過 amacrine cell、horizontal cell、ganglion cell 等視神經細胞將電位訊號送至大腦以產生影像，其中感光細胞(photoreceptor)及視網膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)是視網膜中參與視覺循環的主要場所(圖一)。

在脊椎動物中，視網膜色素上皮是位於脈絡膜(choroidal)及感光細胞之間的單層細胞，因此視網膜色素上皮會作為血液-視網膜屏障(blood retina barrier)，將視網膜和大腦間隔開，避免血液中蛋白質及小分子物質進入視網膜內部空間，並保護視網膜避免受血壓波動和血液成分所造成的影響[2]，此外視網膜色素上皮也具有維持眼睛正常免疫系統及分泌生長激素、酵素、傳遞養分和離子等功能；在營養素代謝方面，視網膜色素上皮具有能和血液中視網醇結合蛋白(retinol binding protein)結合的特殊接受器，此接受器位於脈絡膜和色素上皮細胞表面，能幫助視網膜由血管中擷取新的視網醇(維生素 A 的生物利用形式)，以調節維生素 A 代謝和視覺循環的進行、維持感光細胞的功能[3]。而脊椎動物的感光細胞可分為柱狀細胞(cone cell)及錐狀細胞(rod cell)兩類；桿狀細胞的外觀為細長的桿狀形，而錐狀細胞的外觀則是呈圓錐型結構；由於柱狀細胞及錐狀細胞所搭載的視覺色素不同，柱狀細胞上的視覺色素為 rhodopsin，能吸收由單一光子所發出的訊號，對於光線較敏感，主要負責低光源下的視覺；錐狀細胞上的視覺色素則為 opsin pigment，則是調控日間的視覺，對於光線的敏感度較低，且依對色素光譜敏感度的不同而區分成三類，分別是負責接收短波長光線(藍色)的 S-cone、中波長(綠色)的 M-cone 以及長波長(紅色)的 L-cone，因此相較於柱狀細胞而言，色彩敏感度較高(圖二)[4]。



圖一 視網膜的結構及光線在視網膜中的行進方向

脊椎動物的視網膜是位於眼球的後半部，外來光線會經由角膜、水晶體並進入視網膜中，並抵達視網膜的最外層-視網膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)；眼睛所接收到的光線會在視網膜色素上皮及感光細胞中經視覺循環，將原先的光子轉換成電位訊號，再透過視網膜中其他神經細胞，將電位訊號傳遞到大腦，以形成影像。



圖二 感光細胞(photoreceptor)的種類及分布位置

感光細胞的頂部會和視網膜色素上皮相接，底部則是和視網膜中的神經細胞相連；人類的感光細胞可分為兩大類：柱狀細胞(rod cell)及錐狀細胞(cone cell)，柱狀細胞主要負責低光源下的視覺，而錐狀細胞則對色彩敏感，並可依所吸收到的光線波長不同而分成 S-、M-及 L-cone 三種。

不同生理性別之間視網膜存在先天差異

在過去許多動物實驗或臨床觀察中經常只使用單一生理性別的受測者進行研究，卻沒有考慮因性別不同而造成的生理差異，或是將與生理性別相交的因子，如：荷爾蒙的狀態納入考量。然而近年來不論是在動物實驗或臨床研究報告中皆觀察到，不同生理性別之間，其視網膜的結構、功能及基因表現也會有所差異。

女性的視網膜厚度比男性薄

視網膜光學斷層掃描儀(Optical Coherence Tomography, OCT)在臨床上經常用於檢測黃斑部、視網膜、視神經切面，藉以診斷視網膜的健康狀態。在 Mehreen 等人的臨床報告中，利用 OCT 對受試者視網膜黃斑部進行分析，在排除掉有視網膜或脈絡膜疾病相關病史、以及正在接受眼睛相關治療的受試者後，共有 220 名受試者納入試驗，作者針對不同區域的黃斑部進行觀察，並調整年齡影響因子後，發現不論是在中央凹(fovea)或是距中央凹 3mm 及 6mm 處，男性受試者的黃斑部厚度皆顯著比女性受試者的黃斑部還要厚(圖三)[5]。在另一篇人體研究中，同樣分析了 126 位無任何視覺不適症狀受試者的視網膜厚度，並且從 OCT 檢測結果中看到，男性受試者的整體黃斑部厚度是顯著大於女性受試者的[6]；另外，在 Wong 等人的實驗結果中，則是比較了男女之間整個視網膜的厚度差異：男性視網膜在距視網膜中心 1mm 處的平均厚度為 $203 \pm 23 \mu\text{m}$ ，顯著高於女性的視網膜厚度的 $189 \pm 20 \mu\text{m}$ ($p=0.001$)[7]。而透過上述幾篇健康成人視網膜或黃斑部厚度的分析結果可以明確得知，生理性別男性和女性的視網膜在先天上就存在差異，且女性的視網膜會比男性的視網膜薄。

當知道不同性別間視網膜厚度的差異後，我們試圖了解不同厚度的視網膜到底會不會對視網膜健康產生影響，而經文獻搜尋後，我們找到 Poh 等人所發表的最新臨床研究，此篇研究中分析了健康個體的黃斑部厚度和視網膜健康的相關性，並觀察到視網膜中央或黃斑部週邊區域的厚度較厚者，在視力檢測或視覺敏感度相關功能的表現都比黃斑部厚度薄者還要好[8]。因此可由此結果推論，女性可能會因平均視網膜或黃斑部厚度薄，而造成女性在視覺功能上比男性差。

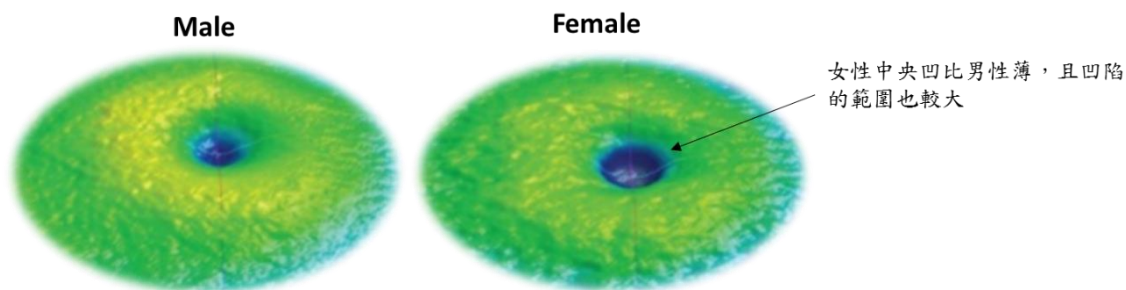


Table 2. Macular thickness measurements in each ETDRS* region by gender in 220 healthy eyes using Topcon SD-OCT system.

MACULAR REGION	MACULAR THICKNESS IN 220 HEALTHY EYES (MEAN ± SD)		
	Males (n = 132)	Females (n = 88)	p value for gender difference
中央凹 Fovea (innermost 1 mm ring)	232.68 ± 21.07 μm	222.87 ± 18.72 μm	<0.0001
Inner 3 mm ring			
Superior	294.31 ± 20.74 μm	284.88 ± 12.03 μm	0.0002
Inferior	290.85 ± 16.48 μm	282.05 ± 10.85 μm	<0.0001
Nasal	296.88 ± 18.67 μm	286.52 ± 13.61 μm	<0.0001
Temporal	278.55 ± 26.65 μm	270.08 ± 16.12 μm	0.0002
Outer 6 mm ring			
Superior	249.40 ± 15.04 μm	243.85 ± 10.48 μm	0.003
Inferior	245.46 ± 14.69 μm	239.49 ± 11.43 μm	0.02
Nasal	271.71 ± 16.03 μm	264.67 ± 12.87 μm	0.005
Temporal	234.26 ± 18.90 μm	229.58 ± 12.63 μm	0.0007
Mean Macular Thickness (average from all 9 regions of ETDRS* map)	266 ± 14.20 μm	258.21 ± 10.03 μm	<0.0001

*ETDRS - Early Treatment Diabetic Retinopathy Study [15].
doi:10.1371/journal.pone.0037638.t002

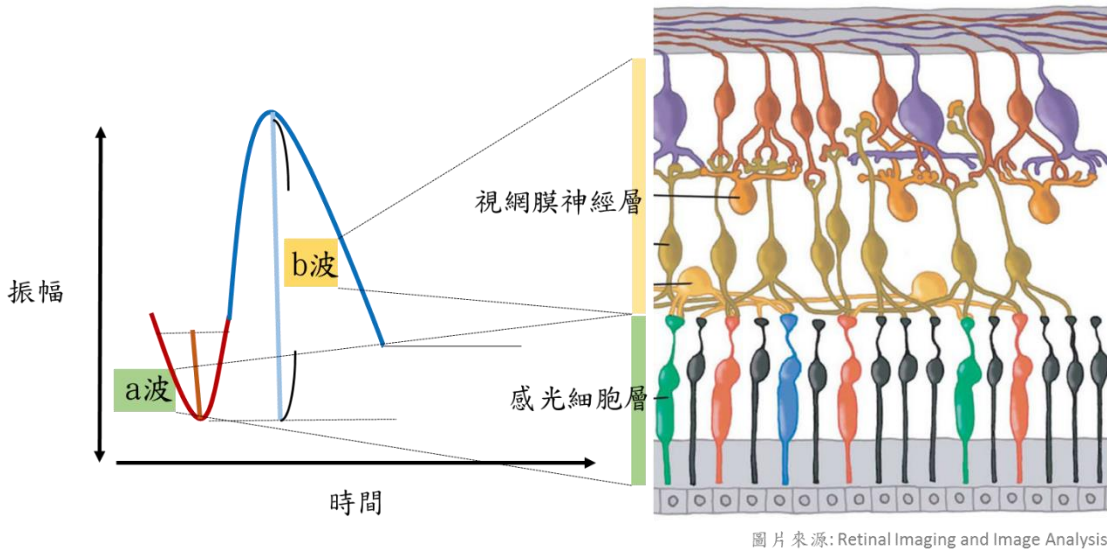
圖三 成年女性的視網膜厚度比男性薄

由 OCT 的立體 3D 圖中可看出，相較於成年男性，女性的視網膜不論是在中央凹或視網膜各個方位，其厚度皆明顯比男性薄。

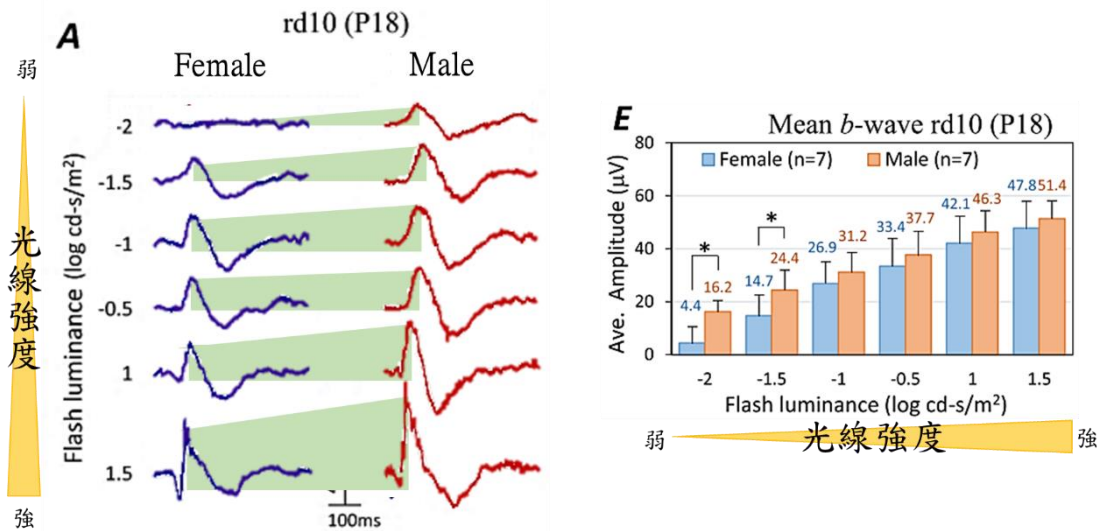
在視網膜退化的動物模型中，雌性小鼠的視網膜功能及細胞型態比雄性小鼠差，且和年齡的增加呈正相關

視網膜電位圖 (electroretinography, ERG) 是藉由測量視網膜內的細胞對光系刺激的反應後所產生的一連串電位反應，來判斷視網膜功能的正常與否，實驗時會透過集波器所收集視網膜受光線刺激後產生的電位波型，若偵測到波形振幅越大，表示視網膜對光線刺激的反應較強，屬功能較健全的視網膜 (圖四)。

實驗中，作者利用 ERG 偵測不同強度的光線刺激下視網膜對光的反應，在出生後的第 25 天時，觀察到兩個現象 (1) 相同強度的光線刺激時，母鼠所偵測到的振幅有小於公鼠的趨勢 (2) 在低光源下，母鼠對光線刺激的反應極小，且顯著低於公鼠 (圖五)。更進一步分析不同年齡的小鼠，同樣會觀察到，在 ERG 測驗中，母鼠對光線的反應所產生的振幅和同年齡公鼠相比是比較小的，且隨年齡的增加，母鼠受光線刺激後產生的振幅也會逐漸變小，顯示出母鼠對光線反應會隨著年齡增加而逐漸變得不敏感 (圖六)；此外在組織切片中也明顯看到，同樣年齡的母鼠和公鼠相比，母鼠的感光細胞數量確實是比公鼠少 (圖七)，因此從功能及組織學的角度上，此研究報告雙重確認不同性別的動物在視網膜上所存在的差異 [9]。

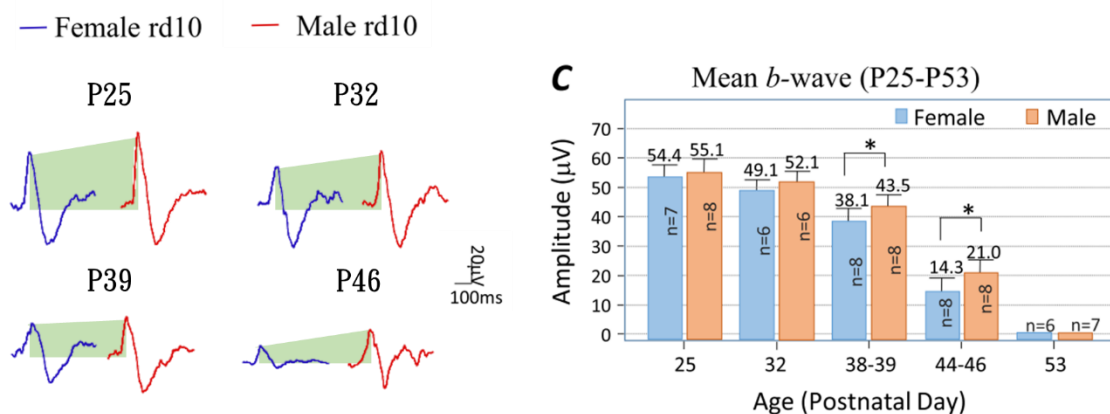


健康的視網膜在接受光線刺激後可透過集波器接收到兩個主要波型，一個振幅較小、開口向上的a波(如紅色曲線所示)，a波主要反應視網膜中感光細胞受光線刺激所產生的變化；而跟隨a波之後的為一個振幅較大、開口向下的正向波：b波(如藍色曲線所示)，而b波所代表的則是視網膜神經層中的細胞接收到感光細胞訊號後，所反應出的訊號強弱。



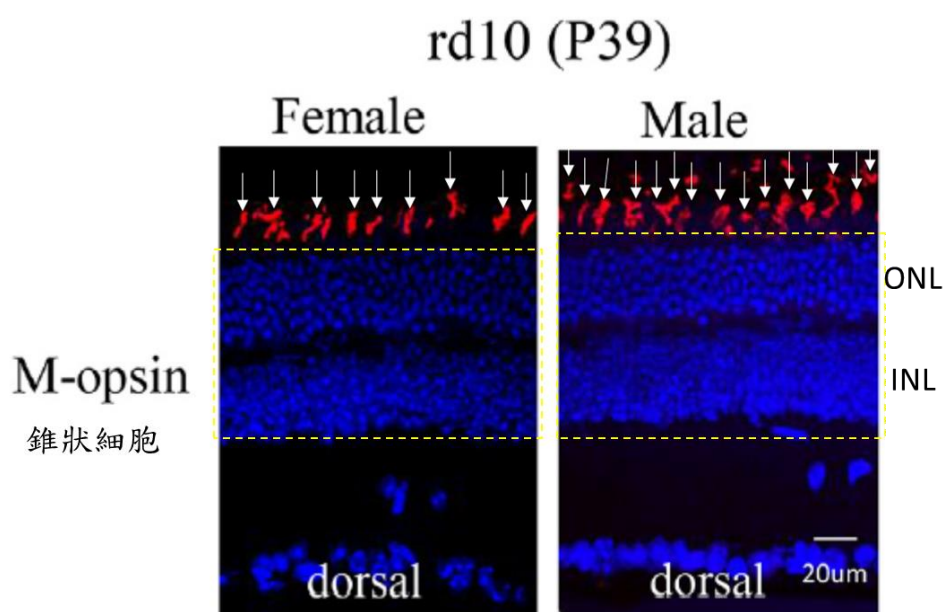
圖五 低光源下，母鼠對光線刺激的反應較不敏感

在低光源下，母鼠(藍色波型)和公鼠相比對光線刺激的反應不敏感，其b波震幅顯著小於公鼠，除低光源刺激外，在高強度的光線刺激下，母鼠對光線刺激的反應也同樣有小於公鼠的趨勢。



圖六 母鼠視網膜功能衰退的程度隨年齡增加而變得更加明顯

以同樣強度的光線刺激進行 ERG 試驗時，不同年齡層的母鼠其 ERG b 波的振幅皆有小於公鼠的趨勢，且 rd10 小鼠在出生後第 39 天(P39)及第 46 天(P46)時，其母鼠 b 波震幅顯著小於公鼠。



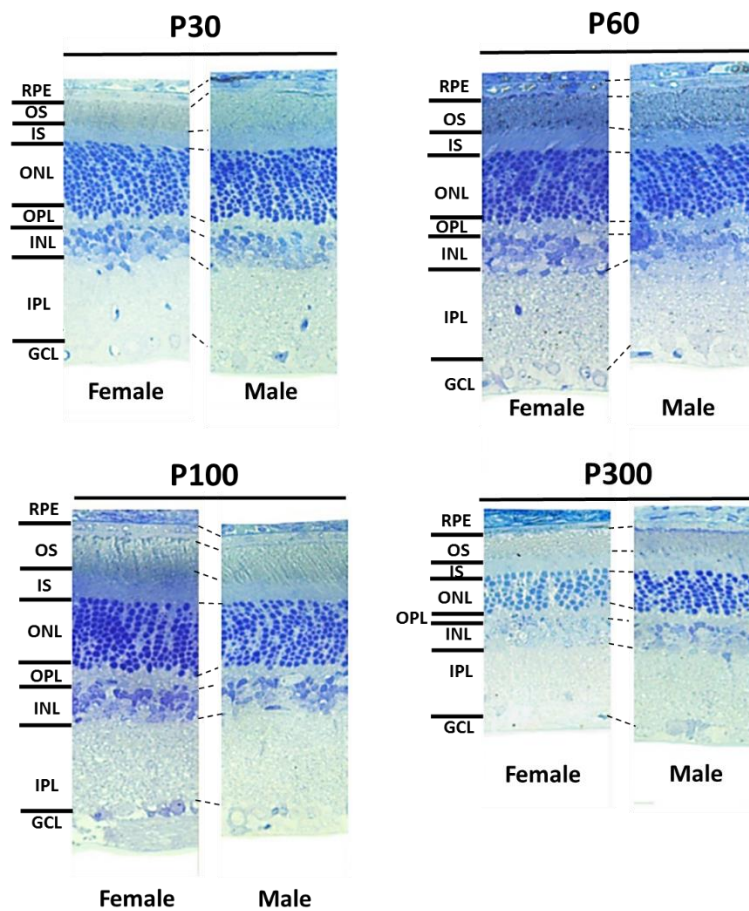
圖七 rd10 母鼠在出生後第 39 天時，錐狀細胞數量明顯少於公鼠

以免疫螢光染色法標定 M-opsin(錐狀細胞之一)，觀察到在出生後第 39 天時，rd10 母鼠的錐狀細胞數量(紅色訊號，以白色箭頭指出)明顯比同年齡的公鼠少；此外，ONL 及 INL 中的藍色訊號(黃色虛線框出)為視網膜中神經細胞核，其在母鼠視網膜中的排列和公鼠相比較為鬆散。

停經或年齡較大的雌性大鼠，其視網膜功能及視網膜結構皆比同樣年齡的雄性大鼠差

在研究報告中，作者利用視網膜電位圖及組織切片等方法，對不同性別及年齡大鼠的視網膜功能及視網膜結構進行分析，由 ERG 的波形圖及統計圖可以明顯看到，同樣都是雌性大鼠，停經前和停經後相比，停經前母鼠的 ERG 振幅顯著大於停經後的組別，除此之外，若不同性別間互相比較，在停經之前，雌性大鼠的視網膜功能會比同年齡的公鼠好；然而在更年期(停經)後，雌性老鼠的視網膜功能會急劇下降，並且明顯比同年齡的公鼠差。

在文獻中，作者也將視網膜分層並分別比較不同年齡及性別間視網膜厚度的差異，並從趨勢圖中觀察到，在停經期後，雌性大鼠的感光細胞核層(ONL)、內叢狀層(IPL)的厚度會明顯下降，且會顯著低於同年齡的公鼠(圖八)，而此組織學的結果和 ERG 結果相符，再次證實雌性大鼠在停經後會出現視網膜厚度變薄的狀況，並伴隨視網膜功能的衰退，使其受光線刺激後所產生的電位反應變差[10]。



圖八 停經後的母鼠其視網膜 ONL 和 IPL 會比同週齡公鼠薄

公鼠和母鼠在壯年時期的視網膜各層厚度並沒有明顯差異(P60 和 P100)，甚至母鼠的視網膜會略厚於同年齡公鼠；但母鼠在停經後(P300)，其視網膜厚度會急遽下降，造成視網膜厚度比同週齡公鼠薄，其中又以 ONL 及 IPL 層差距最為明顯。

女性在感光細胞功能相關基因的表現量遠低於男性

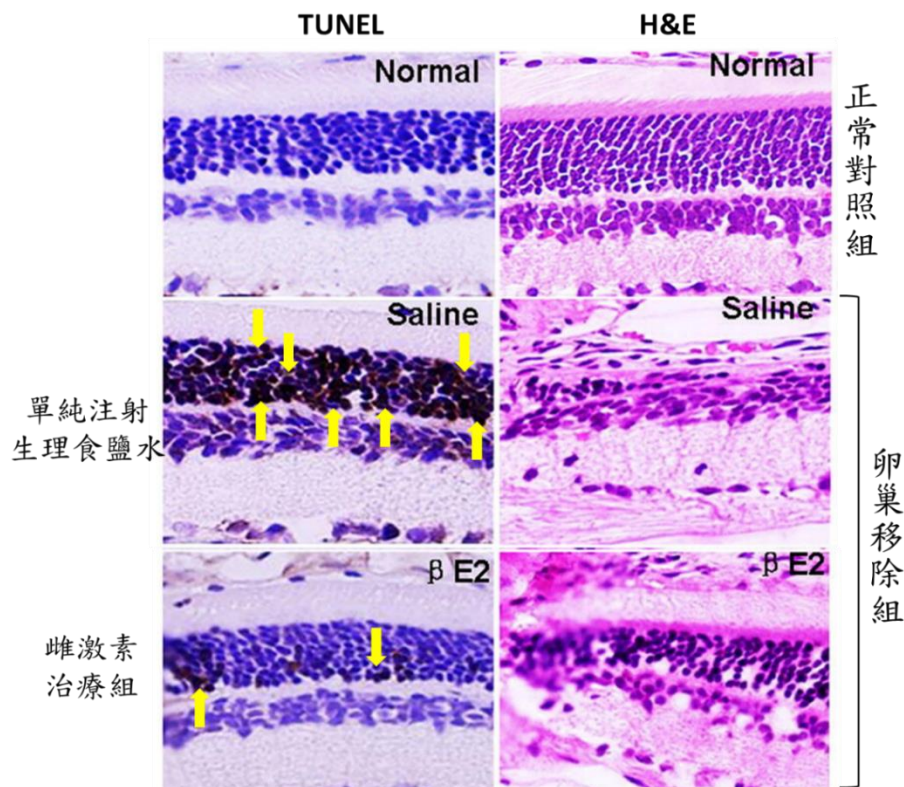
生理性別的不同除了會影響視網膜的結構及功能外，從先前的實驗報告中得知，視網膜中的基因表現量也會受生理性別所影響，而基因是指一段攜帶有遺傳訊息的 DNA 序列，能控制生物個體的性狀表現；在研究中，作者對 33 顆人類眼睛進行基因分析，並觀察到男性在視覺功能相關基因的表現量有高於女性的趨勢，且在這些基因中，共有七組和感光細胞功能相關的基因在男性視網膜中的表現量是女性視網膜中的 1.5 倍，這表示女性的感光細胞功能在先天上和男性相比相對較弱[11]。

賀爾蒙濃度的差異會影響視網膜的健康

眼睛在過去很長一段時間被認為是屬於不受性別差異所影響的組織，但近年來研究發現，視網膜除了會自行利用膽固醇合成雌激素(estrogen)外，也存在許多性類固醇賀爾蒙接受器(sex steroid hormone receptor)[12]，因此造就兩性在視網膜解剖構造或病理生理學上有非常大的差異。

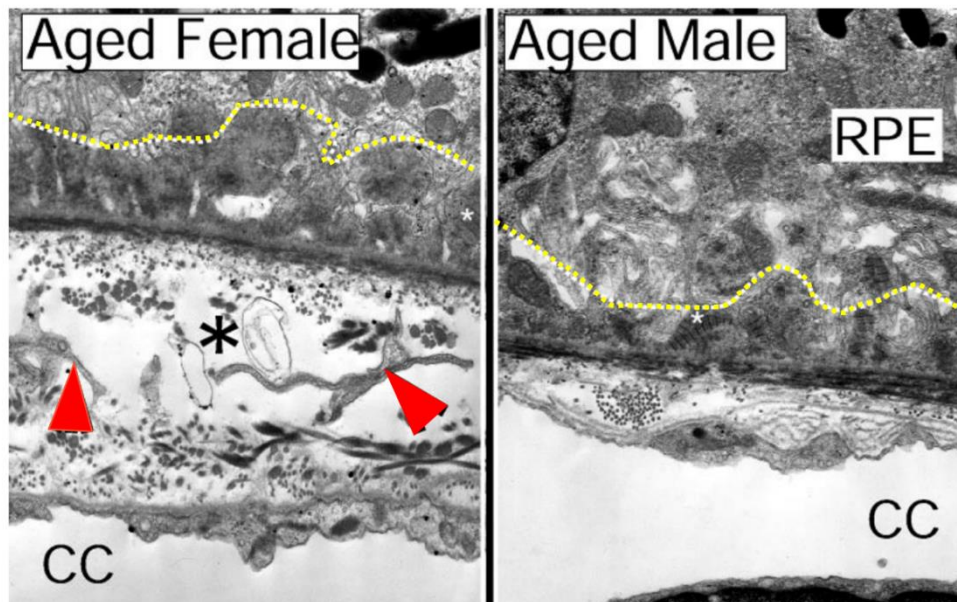
雌激素對視網膜的保護作用

文獻中利用 661 W 細胞株(小鼠感光細胞)進行實驗，並於細胞培養液中添加 5 μ M 麩胺酸以誘導細胞株產生神經毒性傷害，發現若額外給予小鼠感光細胞雌二醇(estradiol)將有利於感光細胞對抗神經毒性，而達到保護神經的效果[13]。此外在動物實驗中，作者利用卵巢移除手術的方式，使雌性小鼠無法分泌足夠的雌激素，並透過 ERG 的檢測視網膜功能，發現卵巢移除的小鼠其視網膜的功能明顯下降，且視網膜中凋亡細胞的數量會大量增加(圖九)，但若給與卵巢移除之小鼠額外補充 17 β -estradiol(雌激素之一)，可以看到此組別的小鼠視網膜的功能會有恢復的趨勢，且凋亡的細胞數量也明顯減少，此實驗結果表明額外補充雌激素能幫助維持雌激素缺乏小鼠的視網膜功能及細胞型態[14]。在另一項動物實驗中，研究者則是利用穿透式電子顯微鏡觀察老年公鼠、母鼠及卵巢摘除的中年母鼠之間視網膜的型態，從電顯圖片中可看到，雖然老年公鼠及母鼠都有觀察到視網膜退化，但缺乏雌激素的老年母鼠之視網膜和公鼠相比是比較薄的，且視網膜色素上皮下的沉積物也更多，除此之外在布克氏膜中也看到，老年母鼠有較多的膠原蛋白碎片累積在其中，且也有來自脈絡膜微血管的內皮細胞侵入(cell invasion)現象，而這很可能是由於脈絡膜微血管新生所導致(圖十)；除此之外，摘除卵巢的母鼠和未摘除卵巢的同年齡母鼠相比，除了布克氏膜的厚度明顯增厚外，視網膜損傷的嚴重程度也更為明顯，但這些在摘除卵巢之母鼠上所觀察到的視網膜損傷，在額外補充雌激素後皆能獲得改善[15]。



圖九 在補充雌激素後，有助於改善卵巢移除小鼠的視網膜細胞凋亡

母鼠在卵巢移除之後，若給予雌激素治療，能顯著減少視網膜中凋亡細胞的數量(黃色箭頭所指的為細胞凋亡的訊號)，並且減少視網膜的萎縮程度。



圖十 穿透式電子顯微鏡下，老年母鼠和公鼠的視網膜比較

老年母鼠除了在視網膜色素上皮下的沉積物和公鼠相比是比較多(黃色虛線下)之外，老年母鼠的布克氏膜中也看到許多膠原蛋白碎片(如黑色星號所示)，同時觀察到布克氏膜中有來自脈絡膜微血管的內皮細胞侵入(cell invasion)(如紅色箭頭所示)。

除動物實驗外，在臨床研究中也同樣證實雌激素的補充有助於改善停經後婦女的視網膜損傷。在一項大型人體試驗中，有 3968 名停經後女性被納入研究，其中有 578 名受試者已接受口服雌激素的治療一年以上，而這些受試者和其餘未接受雌激素療法的停經後婦女相比，其視網膜神經纖維層的受損程度明顯較低，除此之外，這些研究也發現，這些正接受雌激素療法的婦女們眼睛相關疾病的病程進展也會比未接受雌激素療法的受試者輕微[16]，此結果再次證明雌激素對維持視網膜結構是有幫助的。

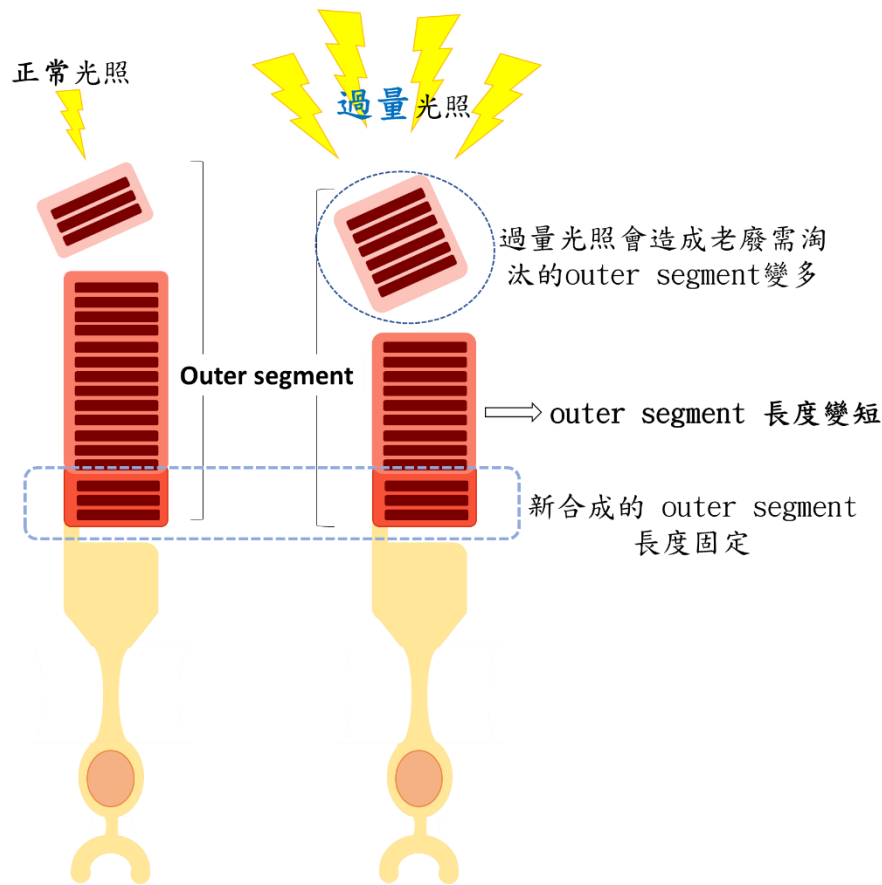
強光照射會造成感光細胞及視網膜色素上皮受損

感光細胞長度縮短

感光細胞是視網膜中最直接受光線所影響的細胞，研究指出，當眼睛暴露於過量的強光下，例如以藍光為主要組成的 LED 燈下，會造成感光細胞的 outer segment 長度變短、感光細胞的 DNA 結構受到破壞，以及感光細胞凋亡。

在正常情況下，為了避免過多的有毒物質累積，感光細胞每日都會進行更新，並代謝老廢的 outer segment，每日約有 10% 的 outer segment 會被更新並自感光細胞上剝離，並且在 outer segment 底部合成新的 outer segment 結構，用以置換受光氧化傷害的部分，使感光細胞的長度保持一定，以維持感光細胞功能的正常運行；然而在 Williams 等人的動物實驗中觀察到，在高強度的光線照射下，會使感光細胞 outer segment 所受的光傷害增加，造成老廢需淘汰的 outer segment 數量變多[17]，而當老廢的 outer segment 量大於感光細胞 outer segment 的合成速度時，就會導致 outer segment 長度變短，並使感光細胞的功能受到影響[18](圖十一)。

除此之外研究中也看到，若將大鼠暴露於強光下 1 小時，就會造成部分感光細胞的細胞核中染色質出現濃縮，而在暴露於強光下 24 小時後，大多數的感光細胞的染色質會有濃縮的現象，並使 DNA 雙股結構裂解、形成 DNA 片斷[19]。在更進一步的研究中，作者比較在照射過量藍光時，感光細胞的變化，並發現感光細胞在吸收藍光後，會使感光細胞中的 AP-1 轉錄因子被活化，進而加速感光細胞被動的程序性死亡，導致視網膜後續光化學傷害的嚴重程度增加[20]。



圖十一 過量光線刺激會導致感光細胞 outer segment 長度變短

在一般狀況下，感光細胞 outer segment 的汰換速率會和新合成 outer segment 的速率相近，以維持感光細胞的長度；但若處於其光環境下，會造成老舊的 outer segment 數量大幅增加並超過新合成 outer segment 的數量，造成感光細胞長度變短，而影響感光細胞的功能。

研究方法

動物

所有野生型 C57BL/6 小鼠均購買自 BioLasco Taiwan Co. Ltd (Taipei, Taiwan) 並均飼養於中山醫學大學動物中心，動物實驗遵循中山醫科大學 IACUC 指南（核准邊號：2521，核准日期：2021 年 8 月 27 日），動物飼育於定溫及濕度固定環境下，並維持 12 小時的光照/黑暗循環，溫度控制於 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，濕度保持在 $55\pm 5\%$ ，動物為自由飲食及飲水。

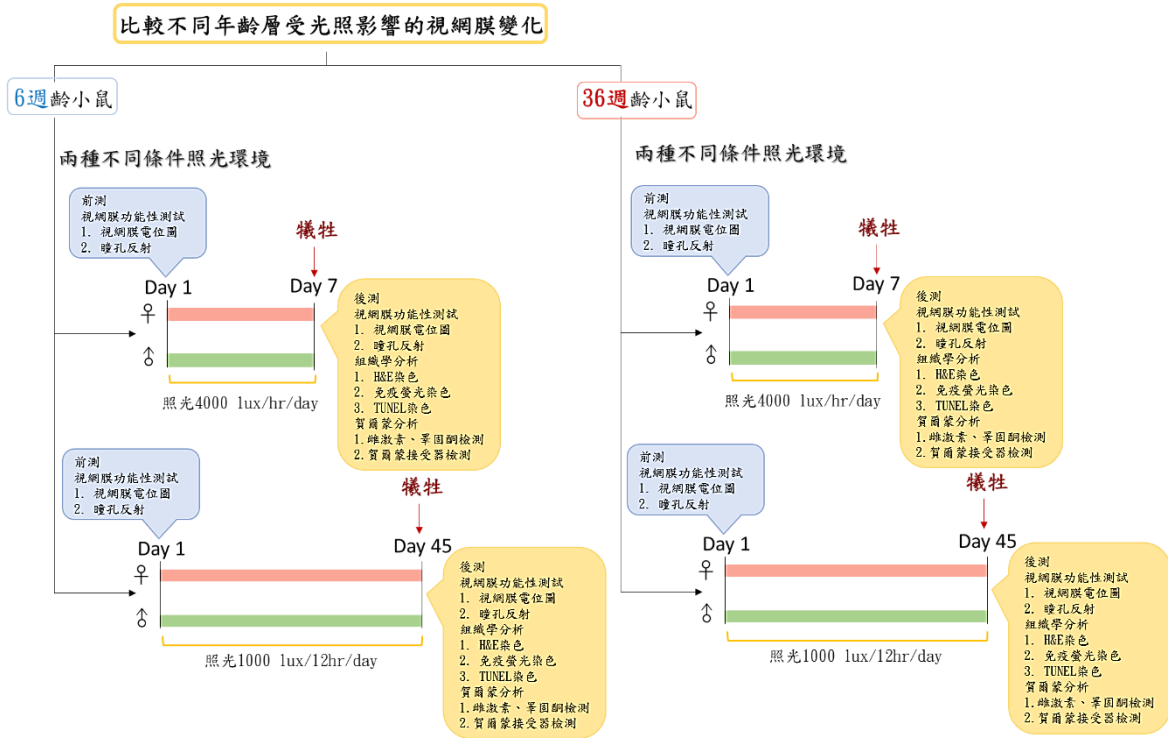
LED 燈架設及實驗分組

為了比較不同性別和年齡之間的光誘導視網膜損傷，本研究使用了兩種性別的 8 週齡和 36 週齡小鼠，小鼠會再隨機分配成兩種不同強度的 LED 光照條件，簡而言之，本研究共分成 8 組實驗組別進行實驗（圖十二）。較低光照強度組設定為每天曝露於 1000 lux、連續 45 天，每日照射 12 小時；高強度光照組別則為連續 7 天、每天接受 1 小時、4500 lux 的光照。LED 燈的光波長峰值為 $450\pm 10\text{nm}$ ，LED 燈條架設於籠子四周，並使用光譜儀 (SRI-PL-6000 +; Optimum Optoelectronics Corp., Chubei City, Taiwan) 進行檢測，測量籠子四個角落的光能量以確保光照條件的穩定。

本計畫以 C57BL/6 品系小鼠進行實驗，實驗分八組進行，共含 3 個不同變相，分別為 A. 公鼠及母鼠 B. 低光源長週期(1000 lux 照 45 天)及強光源短週期(4000 lux 照 7 天)以及 C. 停經前(6

週齡)及停經後(36週齡)。

實驗項目中，以視網膜電位圖、瞳孔反射檢測視網膜的功能，並以組織切片染色 H&E stain 觀察視網膜組織結構是否完整，及免疫螢光染色標定視網膜色素上皮細胞、感光細胞和視網膜神經細胞，觀察視網膜中細胞型態是否發生改變，並以 TUNEL 偵測視網膜中的凋亡細胞；最後利用 ELISA 及西方墨點法，定量不同組別之間，其雌激素、睪固酮和相關賀爾蒙接受器的表現量差異(圖十二)。



圖十二 實驗流程圖

組織病理學分析，蘇木紫-伊紅(Hematoxylin and Eosin, H&E)染色和免疫螢光染色

組織玻片經脫蠟和復水後，會利用 H&E 染色進行組織病理學檢查，並計算以下參數：(1) 感光細胞層厚度；(2) ONL 厚度；(3) INL 厚度。測量方式為分別計算視神經兩側，鼻側及顛側的視網膜厚度，每相距距 200 μm 為一個測量點，使用顯微鏡對每個組織切片進行拍攝，並使用專用軟體計算視網膜各層厚度。

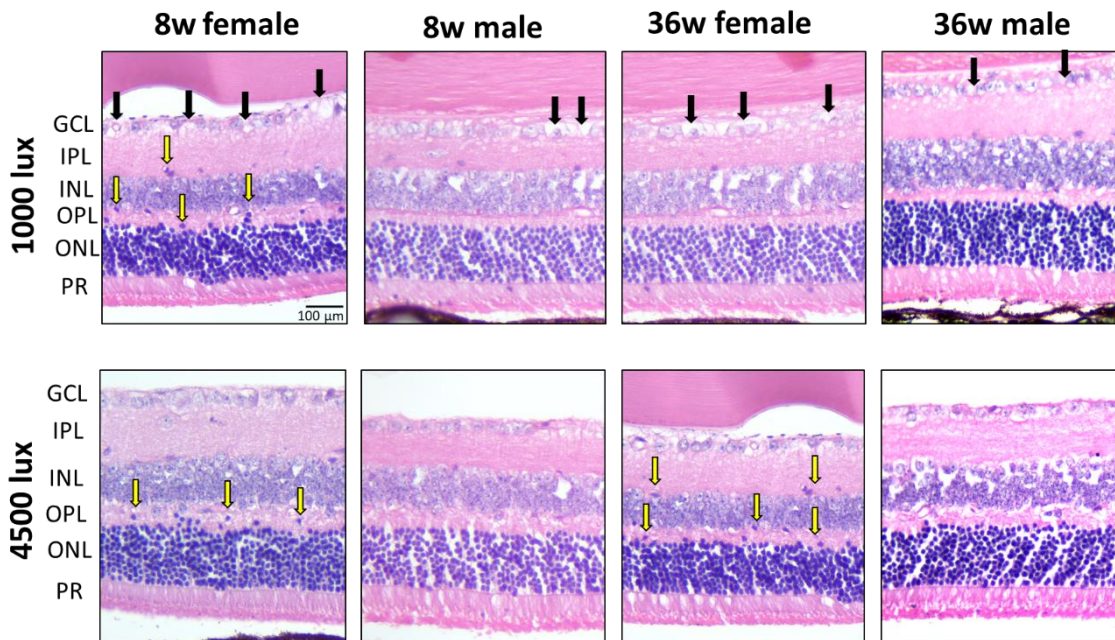
免疫螢光染色中，同樣先將視網膜切片脫蠟和復水後，將切片放入裝有檸檬酸鹽緩衝液的 coplin jar 中，以微波加熱的方式將玻片及緩衝液加熱至沸點，加熱時間為 30 分鐘，以利抗原修復，加熱完成後以冷自來水清洗玻片並在室溫下浸入 5% H_2O_2 溶液 10 分鐘以滅活內源性過氧化物酶，之後，同樣再用自來水洗滌兩次，並將玻片在室溫下浸泡於 1% blocking buffer 中 20 分鐘，並於每片玻片上滴上 100 μl 一抗(以 1% blocking buffer 稀釋)，並於在 4 $^{\circ}\text{C}$ 環境放置過夜。一抗孵育完成後的玻片先以 TBS 清洗 3 次，每次 10 分鐘以完整去除一抗，接著將玻片滴上 100 μl 二抗，於室溫下孵育 2 小時後以 TBS 清洗三次。最後，將玻片風乾並以含 Dapi 的封片膠進行封片以便後續檢測。

結果

LED 燈會造成感光細胞流失及視網膜細胞固縮

研究表明，LED 燈可能會損害視網膜細胞[3]。為了研究不同類型的 LED 光照對視網膜的影響，我們以兩種不同強度及時間的 LED 光照動物模型進行實驗。在 H&E 染色的視網膜石蠟切片中，年輕小鼠在暴

露於低強度 LED 燈後，感光細胞的 outer segment 呈整齊排列(圖十三)。而老年小鼠在暴露於相同條件的 LED 燈後，感光細胞 outer segment 變得鬆散且雜亂，而雌性小鼠的 outer segment 間的縫隙又比雄性小鼠來得大，此外我們也觀察到，在低強度 LED 光照組別中，視網膜神經節細胞 (RGC) 出現液泡變性(vacuolar degeneration)。而高強度 LED 光照同樣會造成感光細胞 outer segment 的大量流失，且其感光細胞退化的程度和低 LED 光照組、但性別年齡一致的小鼠相比，會觀察到更大和更鬆散的 outer segment 間的縫隙。此外，在高強度光照的母鼠視網膜外叢狀層(outer plexiform layer, OPL)、內叢狀層(inner plexiform layer, IPL)和神經節層(ganglion cell layer, GCL)上有明顯固縮的細胞核，但在公鼠中則較少觀察到此現象。



圖十三 各組別之視網膜 H&E 染色結果

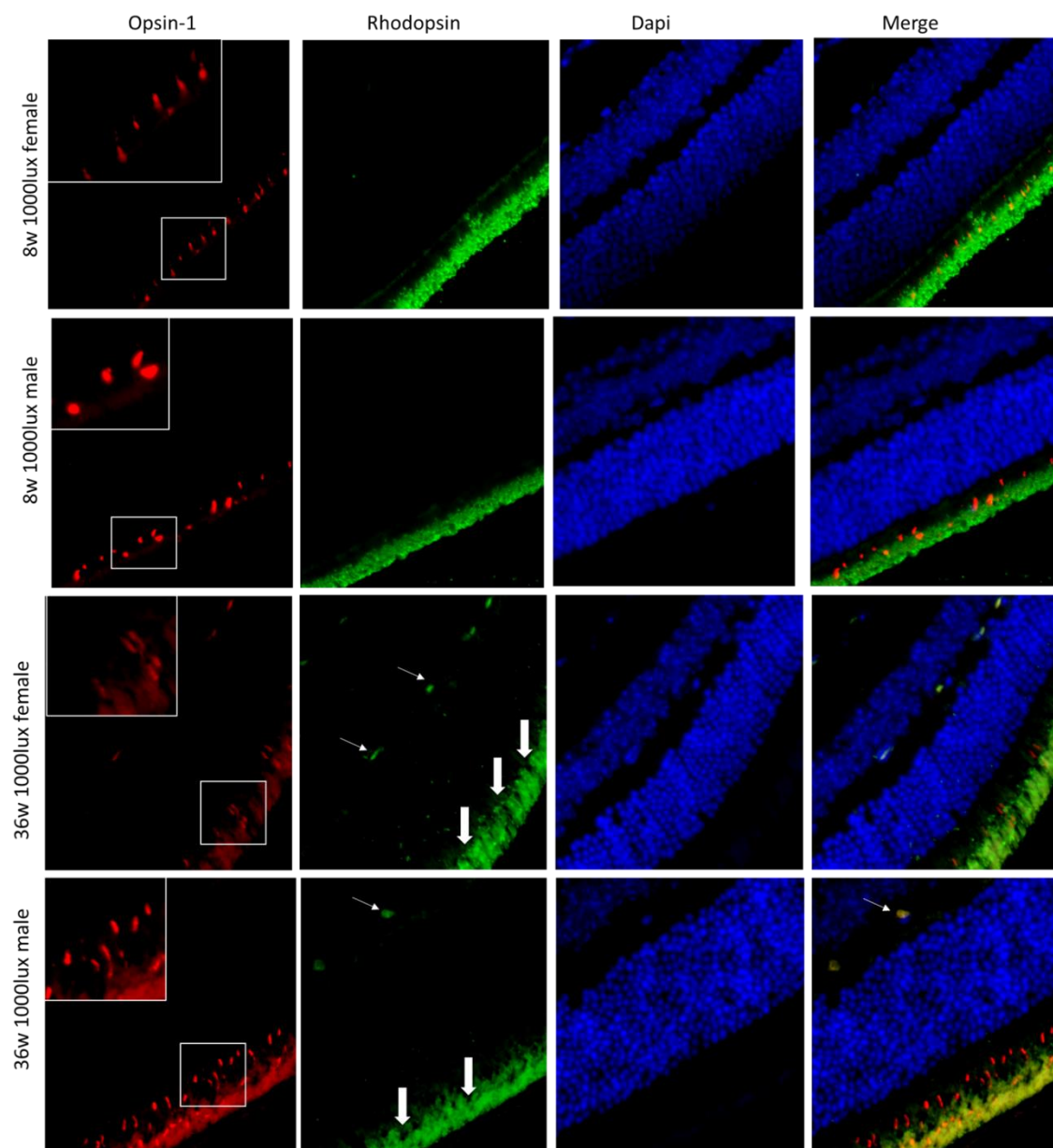
在 1000 lux LED 光照組別中，不論性別及動物年齡，於神經節細胞層(ganglion cell layer, GCL)層皆觀察到明顯的神經節細胞液泡變性(vacuolar degeneration)(黑色箭頭)，而於兩種光照條件的母鼠中，則容易看到視網膜中出現細胞核固縮(黃色箭頭)。

曝露於不同 LED 傷害模式下，柱狀細胞及錐狀細胞的細胞型態會有所差異

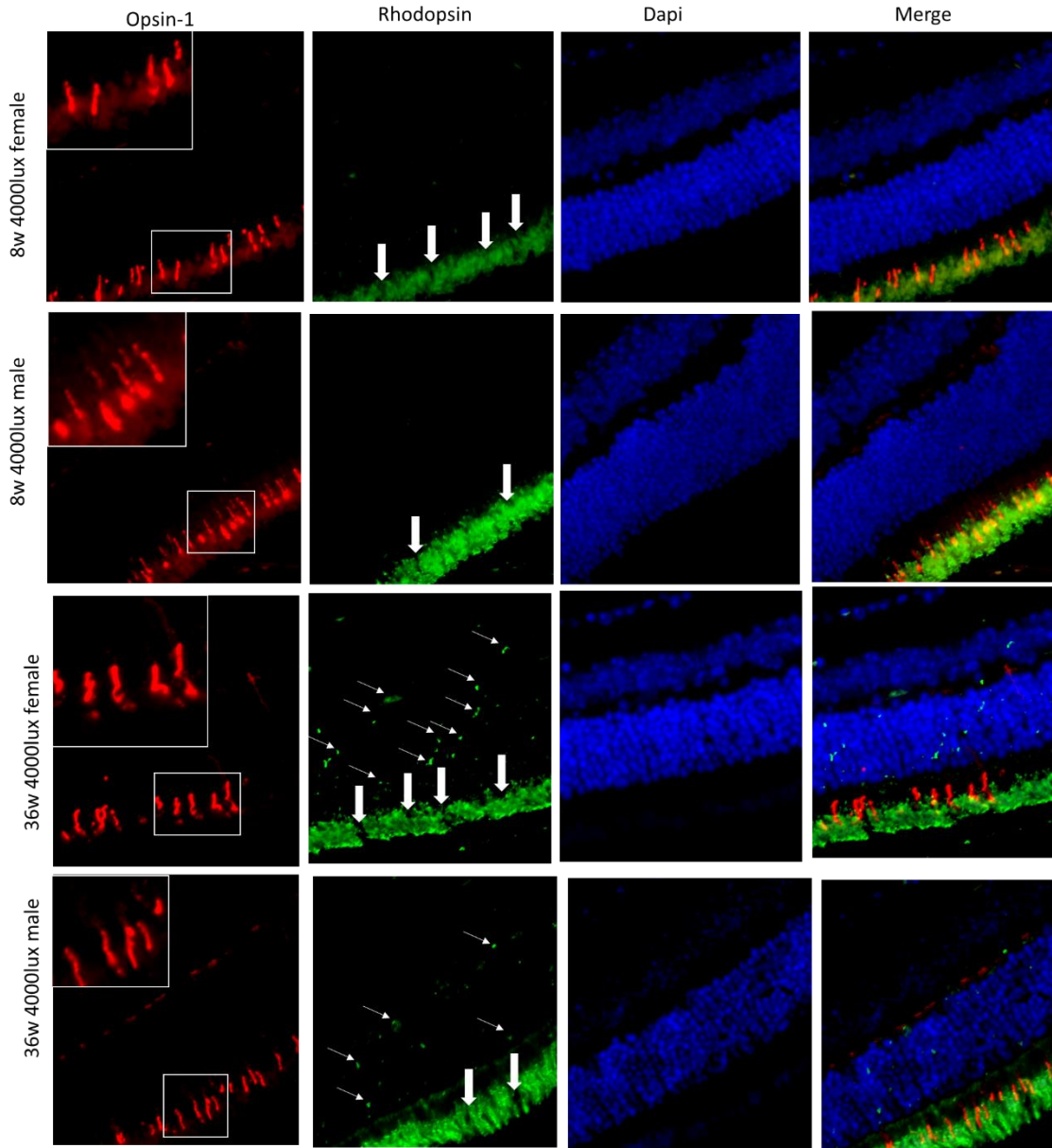
使用 rhodopsin 及 opsin-1(M-opsin)抗體進行免疫染色來檢測各組別的柱狀細胞和錐狀細胞。一般而言，在正常視網膜中 rhodopsin 及 M-opsin 主要分別表現於柱狀細胞和錐狀細胞的 outer segment。經 1000 lux LED 燈照射 45 天後，兩種性別的年輕小鼠柱狀細胞 outer segment 均觀察到 rhodopsin 排列密集且整齊(圖十四)。相比之下，錐狀細胞則異常表現，M-opsin 在健康狀態會呈現典型的細長結構，然而 1000 lux 組別的 M-opsin 型態變得不規則甚至萎縮，而在相同光照條件下的老年小鼠組中，柱狀細胞 outer segment 流失且排列紊亂，甚至在 OPL 中也觀察有部分 rhodopsin 表現，此結果表示柱狀細胞可能出現錯誤定位(mislocalization)的狀況；而在 1000 lux 光照條件下年老小鼠的錐狀細胞也表現出顯著的形態差異，錐狀細胞 outer segment 呈寬卵形，且部分錐狀細胞的延伸方向從垂直轉變為水平延伸。

感光細胞的細胞形態在高強度 LED 光照組別中有別於低強度光照，由免疫螢光染色結果中觀察到(圖十五)，高強度光照組別的 M-opsin 表現仍保持正常的細長外觀，且在所有 4500 lux 光照組中，無論是年輕小鼠還是老年小鼠，錐狀細胞 outer segment 的數量和密度都較高；然而曝露於高強度 LED 燈似乎對柱狀細胞的影響大於錐狀細胞，在年輕的小鼠中，rhodopsin 被破壞並聚縮，且部分 rhodopsin

會被錯誤定位到 ONL 或 OPL，此現象於高強度光照的年老小鼠中更為明顯，感光細胞層除了出現大範圍的 rhodopsin 聚縮外，柱狀細胞 outer segment 明顯斷裂且從 ONL 到 INL 都出現 rhodopsin 碎片，因此推測在強烈的 LED 光照射下，柱狀細胞的退化會先於錐狀細胞。



圖十四 在 1000 lux 的 LED 光照組中，錐狀細胞退化為主要特徵。從 opsin-1 訊號中看到，錐狀細胞多聚縮成較短的卵圓狀，而已 rhodopsin 檢測柱狀細胞 outer segment，年輕組別的 rhodopsin 訊號為整齊排列，而年老組別 rhodopsin 間則出現縫隙(白色箭頭)且有少許 rhodopsin 碎片。



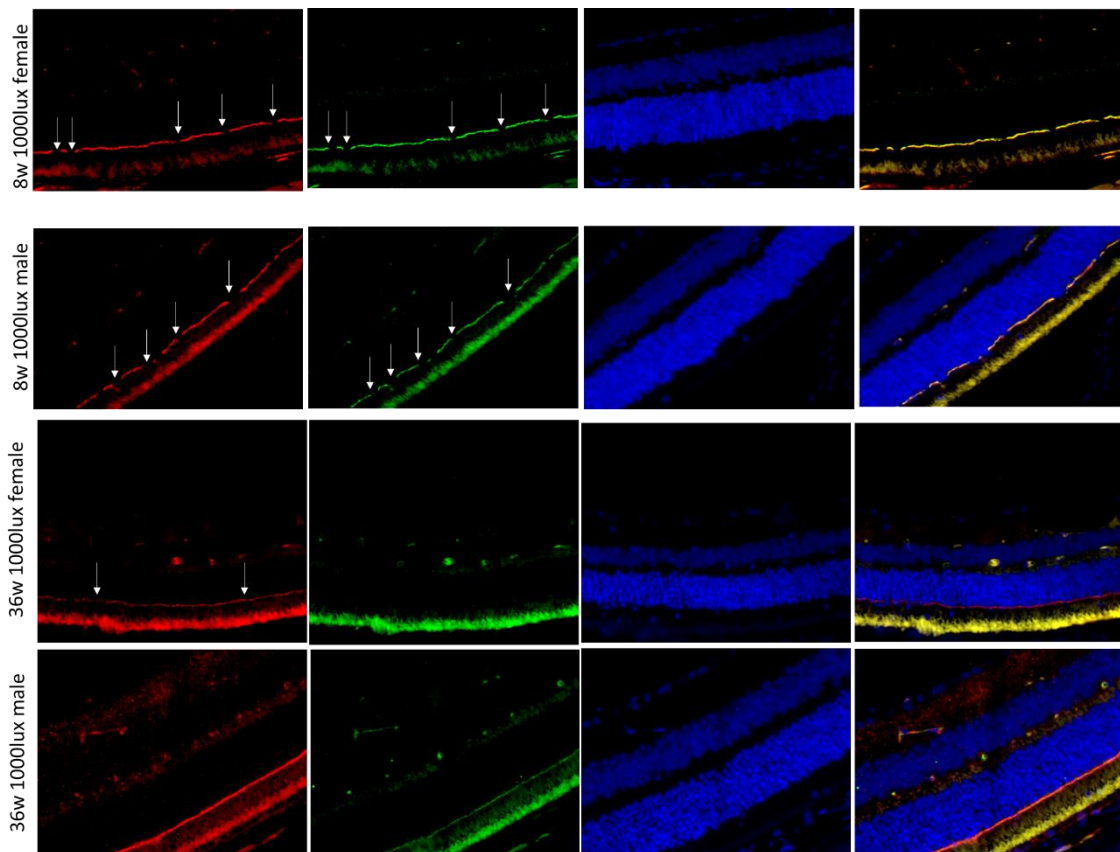
圖十五 高強度、短時間的 LED 燈主要使柱狀細胞受損。年輕及年老組別的小鼠，其 opsin-1 呈現典型健康狀態的短棒結構，而 rhodopsin 所標定的柱狀細胞中，年輕組別 rhodopsin 間出現小縫隙(白色粗箭頭)，年老組別除 rhodopsin 間有明顯縫隙外，於視網膜其他層有顯著 rhodopsin 碎片散佈(白色細箭頭)。

細胞連接的結構表現變化可能導因於不同的光照條件

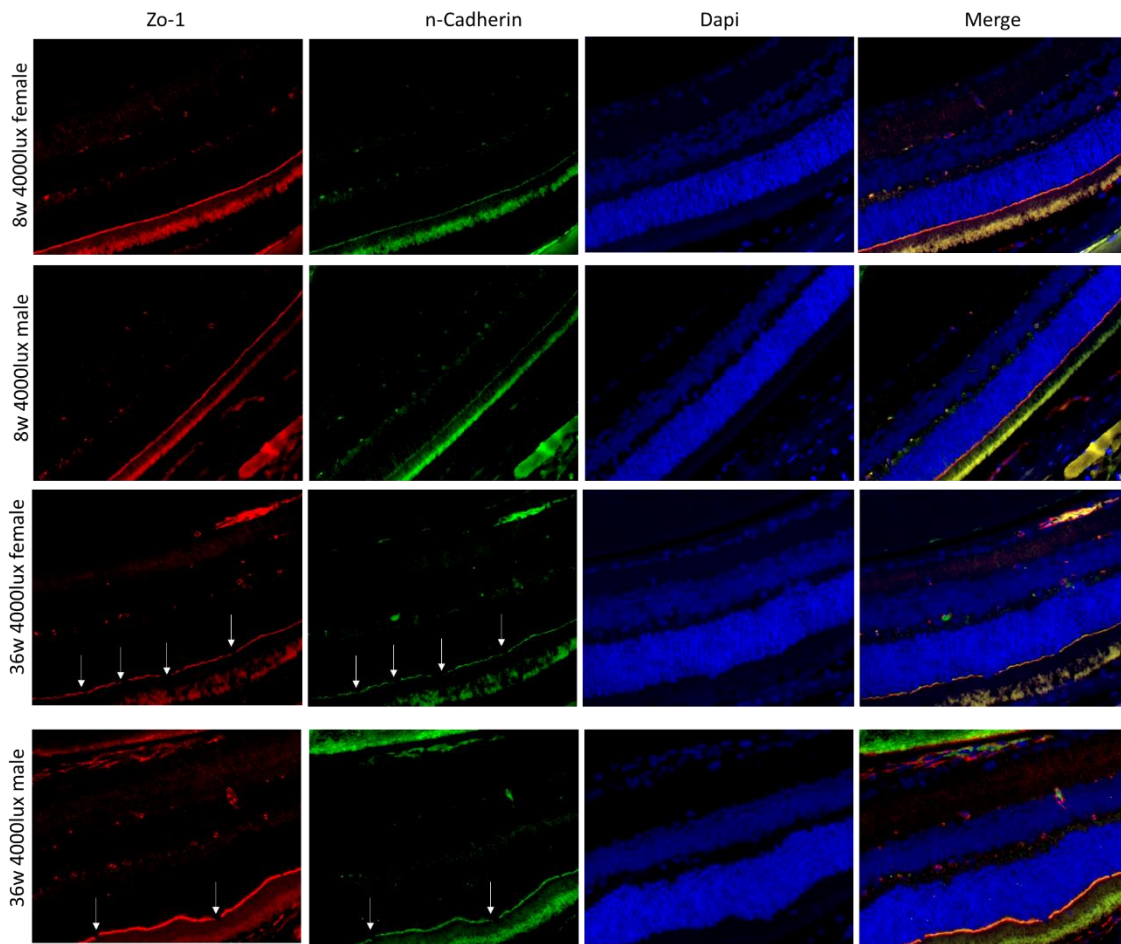
先前的實驗中觀察到不同 LED 光照條件會造成柱狀細胞或錐狀細胞的損傷順序有所差異(圖十六)，接著本實驗檢查了感光細胞 inner segment 的起始位置與相鄰的 Müller glia end feet 之間的細胞連接完整性，一般而言視網膜 outer limiting layer (OLM)區域的 tight junctions 處會有 ZO-1 蛋白及 adhesion molecules，例如 N-Cadherin 蛋白表現。在 1000 lux LED 光照條件下，兩種性別的年輕小鼠視網膜中，ZO-1 和 N-cadherin 皆於 OLM 處形成不連續的斷線表現(白色箭頭)，此外在 OPL 中也觀察到有少數 ZO-1 和 N-cadherin 的點狀表現；而在相同光傷害模式但年老小鼠的視網膜中，則發現與年輕小鼠相比，OLM 的損害更為嚴重，老年母鼠的 ZO-1 間出現較大的間隙，且在 OLM 中幾乎檢測不到 N-Cadherin 的 adherens junction，而在年老公鼠的視網膜中，ZO-1 和 N-Cadherin 的整體表現趨勢與年老母鼠的趨勢相似，年老公鼠的視網膜 OLM 處仍可偵測到 N-Cadherin 訊號，但表現量顯著降低，此外低強度 LED 光照組別中，於 OPL 及 IPL 觀察到有 ZO-1⁺和 N-cadherin⁺點狀訊號出現，在年

老母鼠視網膜的 OPL 及 IPL 中有部分較大的點狀 ZO-1 及 N-cadherin 表現，且部分訊號為 ZO-1 及 N-Cadherin 重疊；與此同時，年老公鼠的 OPL 及 IPL 也檢測到強烈的點狀 ZO-1 訊號，且在年老公鼠的點狀 ZO-1、N-Cadherin 表現量更高。

同樣檢測 4500 lux LED 光照組別的視網膜中 ZO-1 及 N-Cadherin 表現(圖十七)，在年輕小鼠的視網膜中，ZO-1 在 OLM 處會呈一條連續的線狀表現，雖然同樣有少許 ZO-1⁺的點狀訊號表現於視網膜，但在 OPL 和 IPL 並無觀察到明顯的大面積 ZO-1 斑塊狀訊號；然而在年輕小鼠、4500 lux 光傷害的視網膜中，N-Cadherin 的免疫色訊號於 OLM 處呈不連續線狀且支離破碎，並且此組別中在 OPL 和 IPL 也檢測到了點狀 N-Cadherin 訊號且這些訊號會與 ZO-1 共同表現。在此強光照射的年老公鼠視網膜中，OLM 區域中 ZO-1 和 N-Cadherin 皆呈不連續的片段化表現，並在 OPL 和 IPL 上除了有部分 ZO-1 與 N-Cadherin 點狀訊號的共同表現外，ZO-1 免疫螢光訊號也呈斑點狀的密集聚集在 IPL 和 GCL 上，而 N-cadherin 除了與 ZO-1 共定位外，也在 OPL 上也有部分大面積斑塊表現。感光細胞 inner segment 和 Müller cell end feet 間的細胞連接對感光細胞的結構完整性至關重要，除此之外 ZO-1 和 N-cadherin 也與視網膜中其他神經細胞的连接蛋白或緊密粘附有關係，因此，ZO-1 和 N-Cadherin 在兩種不同光照模式的表現特徵不同，也可能歸因於視網膜受 LED 光損傷所造成的視網膜膜細胞損傷順序差異。



圖十六 長時間較低強度的 LED 光照會使細胞連結的結構受到破壞。ZO-1 及 N-Cadherin 分別標定於感光細胞與 Müller cell 間的 tight junction 及 adherens junction，低強度、長時間的 LED 光照會使細胞間連結呈現片斷狀(白色箭頭所示)。



圖十七 短時間高強度的 LED 燈會使年老老鼠的細胞連結受損。年輕小鼠暴露於高強度 LED 燈下，並不會對感光細胞和 Müller cell 間的結構造成明顯破壞，然而在老化小鼠中，高強度 LED 燈卻會使 ZO-1 及 N-Cadherin 的表現量下降並呈現斷斷續續的型態。

討論

本實驗在控制總光能量的前提下調整小鼠所曝露的 LED 燈的光照強度和時間，觀察到不同的光照模式會導致柱狀細胞和錐狀細胞退化順序也有所不同。許多研究表明強光會導致視網膜損傷，感光細胞中的 rhodopsin 會吸收光子，而過多的光子進入感光細胞後會產生光毒性並促使感光細胞凋亡[18]，其中短波長的光所產生 ROS 的能力更強[19]，其所造成的感光細胞損傷比白光和綠光更為嚴重[20][21]，除此之外，視網膜損傷的嚴重程度還受光照強度、曝光時間、年齡、性別、晝夜節律等因素所影響[4]，在視網膜中，光導致的視網膜退化過程起始於 rhodopsin 對光子的吸收，並活化後續一系列的 phototransduction cascade 並產生氧化壓力[22]。柱狀細胞的 outer segment 縮短或感光細胞死亡是光誘導視網膜損傷模型中常提到的特徵，然而，Contin 等人的研究中提到，視網膜損傷的機制和細胞形態差異可能受光照條件或光照時所影響[4]，在本研究中，曝露在相對較低強度的 LED 後，視網膜中的錐狀細胞除了變得畸形外，部分錐狀細胞的延伸方向也由原先的垂直於視網膜變成水平延伸，這種形態變化類似於 *RPE65*^{-/-} 或 *LRAT*^{-/-} 轉基因小鼠，在 *RPE65*^{-/-} 小鼠模型中，錐狀細胞的視蛋白會因為從 inner segment 到 outer segment 的運輸受阻，而導致視錐蛋白的錯誤運輸(mistrafficking)和積累[23]。此外，在 *RPE65*^{-/-} 小鼠視網膜中觀察到的錐視蛋白的 mRNA 表現量顯著下降，而 rhodopsin mRNA 表現則無明顯改變[24]。Zhang 等人的實驗中也發現，在 *RPE65*^{-/-} 和 *LRAT*^{-/-} 動物模型中，apo-rhodopsin 運輸正常且退化進程緩慢，但錐狀細胞的退化就相當迅速[25]，這些研究和本研究有

相似的結果，在 1000 lux LED 組別中，錐狀細胞的退化速度比柱狀細胞更快。Retinoid isomerase (RPE65)和 lecithin-retinol acyltransferase (LRAT)會參與視網膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)中的 11-cis retinal 循環，當此兩種酵素突變時會導致視覺週期中斷。研究報告指出 11-cis retinal 缺乏會引發視錐蛋白不正常聚集和 cone-opsin 降解，且 11-cis retinal 對於 cone-opsin 的構成是必需的並且能促進視蛋白的穩定性[25]，早期給予 11-cis retinal 有助於改善視錐細胞的流失[24]，從這個角度上來說，我們推測此研究中所觀察到 1000 lux LED 光照所導致的錐狀細胞型態異常，部分原因可能源於 RPE 功能障礙所導致，並進一步影響視覺循環的運行。事實上文獻中也確實在 *in vitro* and *in vivo* 中看到 LED 或藍光會透過氧化壓力增加而進一步導致 RPE 細胞死亡[1][26]，且細胞形態分析上也確實顯示 LED 或藍光會使 RPE 增厚及混亂排列[27]。

在相對低強度的 LED 光照組別中，透過 ZO-1 及 N-Cadherin 檢測觀察到 OLM 的完整性會受到破壞，顯示感光細胞和 Müller cell 間的連接受到降解，OLM 中包含 tight junction 和 adherens junction，有助於細胞結構和屏障功能的維持[28]。因此，OLM 中 ZO-1 呈不連續的線狀表現可能與感光器的流失有關，此現象也同樣於其他視網膜退化動物膜中被觀察到[29]，此外在本研究中，於 OPL 和 IPL 中也檢測到 ZO-1 的異位表現，並且此 ZO-1 異位表現會隨著強 LED 光的增強和年齡的增加而上升，推測此現象可能與連接蛋白的轉移有關，由原先 Müller cell 與感光細胞的連接處轉移到 Müller cell 與其他視網膜細胞之間的連接處[30]。此外，先前的研究中提到在視網膜變退化中，錐狀細胞的重排(rearrangement)也與 ZO-1 蛋白有關，柱狀細胞死亡後，錐狀細胞也會逐漸流失並同時觸發 Müller cell 合成中間絲，並會觀察到 Müller cell 會傾向於與錐狀細胞形成纖維化密封(fibrotic sealing)，而此過程中會向上調節 ZO-1 蛋白並參與關鍵作用[31]-[33]。因此我們認為，在 1000 lux 組別中所觀察到較明顯 ZO-1 的異位表現，除了感光細胞與 Müller cell 間連接的改變外，可能也和錐狀細胞的重新排列有關。而在 OPL 和 IPL 中所觀察到的 N-Cadherin 表現則可能與神經源性簇(neurogenic clusters)的形成有關，當 N-cadherin 向下調節時，會抑制 Müller glia-derived progenitor cell 的遷移及神經元再生[34]，因此我們認為，ZO-1 及 N-Cadherin 在兩種不同的 LED 光損傷模式中的表現差異，也是因視網膜損傷起始位置不同所導致後續細胞的修復機制的差異所造成。

活化也會使 Müller cell 對視網膜氧化壓力產生一系列級聯反應，包含 Müller cell 本身會出現分子和結構改變，即 gliosis，包括中間絲的形成(GFAP、Vimentin 和 Nestin)的向上調節、細胞肥大(cellular hypertrophy)和 ERK1/2 訊息傳遞路徑的活化[48][49]，如同 microglia，Müller cell 的活化也會對視網膜神經元有雙向作用，細胞保護和細胞毒性。在視網膜損傷早期階段，Müller cell 的 gliosis 會釋放神經保護因子並維持神經元功能已延長神經元存活時間[48]，然而，若長時間處於 gliosis 狀態，則會增加促發炎細胞因子的分泌，並導致細胞異常增殖，使視網膜神經元損傷加劇[48]。在我們的結果中，除了年輕小鼠的高強度 LED 光照組外，其餘實驗組皆觀察到 GFAP 大量表現，從 OPL 到 GCL 皆可偵測到 GFAP，我們認為，較低強度但較長時間的 LED 光照會導致視網膜處於慢性光毒性和發炎狀態，從而導致 microglia 的持續活化，以及 microglia 的持續活化反向誘導 Müller cell 長時間處於 gliosis 的狀態，也確實於 1000lux LED 組別中偵測到較高的 GFAP 表現。

參考文獻

- [1] M. Zetterberg, "Age-related eye disease and gender," *Maturitas*, vol. 83, pp. 19–26, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.maturitas.2015.10.005.
- [2] C. Onder *et al.*, "Relationship between retinopathy and cirrhosis," *World J.*

- Gastroenterol.*, vol. 11, no. 14, pp. 2193 – 2196, 2005, doi: 10.3748/wjg.v11.i14.2193.
- [3] M. Kelly, M. A. K. Widjaja-Adhi, G. Palczewski, and J. VonLintig, “Transport of Vitamin A across blood-tissue barriers is facilitated by STRA6,” *FASEB J.*, vol. 30, no. 8, pp. 2985 – 2995, 2016, doi: 10.1096/fj.201600446R.
- [4] K. Cholkar, S. R. Dasari, D. Pal, and A. K. Mitra, *Eye: Anatomy, physiology and barriers to drug delivery*. 2013.
- [5] M. Adhi, S. Aziz, K. Muhammad, and M. I. Adhi, “Macular thickness by age and gender in healthy eyes using spectral domain optical coherence tomography,” *PLoS One*, vol. 7, no. 5, pp. 5 – 10, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0037638.
- [6] A. H. Kashani *et al.*, “Retinal Thickness Analysis by Race, Gender, and Age Using Stratus OCT,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 149, no. 3, pp. 496–502.e1, 2010, doi: 10.1016/j.ajo.2009.09.025.
- [7] A. C. M. Wong, C. W. N. Chan, and S. P. Hui, “Relationship of gender, body mass index, and axial length with central retinal thickness using optical coherence tomography,” *Eye*, vol. 19, no. 3, pp. 292 – 297, 2005, doi: 10.1038/sj.eye.6701466.
- [8] S. Poh *et al.*, “Association between Macular Thickness Profiles and Visual Function in Healthy Eyes: The Singapore Epidemiology of Eye Diseases (SEED) Study,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1 – 7, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-63063-y.
- [9] B. Li, S. Gografe, A. Munchow, M. Lopez-Toledano, Z. H. Pan, and W. Shen, “Sex-related differences in the progressive retinal degeneration of the rd10 mouse,” *Exp. Eye Res.*, vol. 187, no. August, p. 107773, 2019, doi: 10.1016/j.exer.2019.107773.
- [10] S. Chaychi, A. Polosa, and P. Lachapelle, “Differences in retinal structure and function between aging male and female Sprague-Dawley rats are strongly influenced by the estrus cycle,” *PLoS One*, vol. 10, no. 8, pp. 1 – 16, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0136056.
- [11] I. Chowers *et al.*, “Gene expression variation in the adult human retina,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 12, no. 22, pp. 2881 – 2893, 2003, doi: 10.1093/hmg/ddg326.
- [12] L. A. Wickham, J. Gao, I. Toda, E. M. Rocha, M. Ono, and D. A. Sullivan, “Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye,” *Acta Ophthalmol. Scand.*, vol. 78, no. 2, pp. 146 – 153, Apr. 2000, doi: 10.1034/j.1600-0420.2000.078002146.x.
- [13] E. Nixon and J. W. Simpkins, “Neuroprotective Effects of Nonfeminizing Estrogens in Retinal Photoreceptor Neurons,” *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 53, no. 8, p. 4739, Jul. 2012, doi: 10.1167/iovs.12-9517.
- [14] M. -S. Mo, H. -B. Li, B. -Y. Wang, S. -L. Wang, Z. -L. Zhu, and X. -R. Yu, “PI3K/Akt and NF- κ B activation following intravitreal administration of 17 β -estradiol: Neuroprotection of the rat retina from light-induced apoptosis,” *Neuroscience*, vol. 228, pp. 1 – 12, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.002.
- [15] S. W. Cousins, M. E. Marin-Castaño, D. G. Espinosa-Heidmann, A. Alexandridou, L. Striker, and S. Elliot, “Female gender, estrogen loss, and sub-RPE deposit formation in aged mice,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 44, no. 3, pp. 1221 – 1229, 2003, doi: 10.1167/iovs.02-0285.
- [16] K. S. Na, D. H. Jee, K. Han, Y. G. Park, M. S. Kim, and E. C. Kim, “The ocular benefits of estrogen replacement therapy: A population-based study in postmenopausal Korean

- women,” *PLoS One*, vol. 9, no. 9, pp. 1 – 6, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0106473.
- [17] T. P. Williams and J. S. Penn, “Intracellular topography of rhodopsin regeneration in vertebrate rods,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 86, no. 3, pp. 413 – 422, 1985, doi: 10.1085/jgp.86.3.413.
- [18] D. T. Organisciak and D. K. Vaughan, “Retinal Light Damage: Mechanisms and Protection,” *Prog Retin Eye Res.*, vol. 29, no. 2, pp. 113 – 134, 2011, doi: 10.1016/j.preteyeres.2009.11.004. Retinal.
- [19] C. E. Remé *et al.*, “Light-Induced Apoptosis in the Rat Retina in Vivo,” *Degener. Dis. Retin.*, pp. 19 – 25, 1995, doi: 10.1007/978-1-4615-1897-6_3.
- [20] C. Grimm, A. Wenzel, T. P. Williams, P. O. Rol, F. Hafezi, and C. E. Remé, “Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: Effect of photoreversal of bleaching,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 42, no. 2, pp. 497 – 505, 2001.
- [21] R. R. Rando, “The biochemistry of the visual cycle,” *Chem. Rev.*, vol. 101, no. 7, pp. 1881 – 1896, 2001, doi: 10.1021/cr960141c.
- [22] K. I. Mazzitello, C. M. Arizmendi, F. Family, and H. E. Grossniklaus, “Formation and growth of lipofuscin in the retinal pigment epithelium cells,” *Phys. Rev.*, pp. 1 – 7, 2009, doi: 10.1103/PhysRevE.80.051908.

110年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：張菡馨		計畫編號：110-2629-B-040-001-			
計畫名稱：LED導致視網膜損傷的性別差異化探討：聚焦於視網膜色素上皮及感光細胞的研究					
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	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	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	1		本研究計有一名碩士生參與，主要工作為照顧動物、執行實驗、並學習統整實驗結果與分析。
		博士生	1		本研究計有一名博士生參與，主要工作為照顧動物、執行實驗、統整及分析實驗結果、同時學習期刊論文寫作與發表。
		博士級研究人員	0		
	專任人員	0			
	非本國籍	大專生	0		
		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。)					