

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 海洋深層水對卵巢去除引起之骨質疏鬆的延緩效果
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 陳珮溱
學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-047-B
研究期間： 105年07月01日至106年02月28日止，計8個月
指導教授： 李慧禎

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學系

中華民國 106年03月30日

【目錄】

●中英文摘要

第一章、序論.....	1
(一)骨骼組織.....	1
(二)骨生成作用(osteogenic).....	3
(三)蝕骨作用(osteoclastogenic).....	4
(四)骨質動態平衡的控制.....	4
(五)成骨細胞、蝕骨細胞與脂肪細胞之關係.....	5
(六)骨質疏鬆症.....	5
(七)雌激素與骨質疏鬆症.....	7
(八)鎂離子與骨質的關聯性.....	8
(九)海洋深層水.....	8
第二章、研究動機.....	10
第三章、研究架構.....	11
第四章、實驗材料與方法.....	12
(一)實驗材料.....	12
(二)實驗方法.....	14
第五章、實驗結果.....	19
【動物實驗】	
1. 海洋深層水對卵巢切除大白鼠血液生化之影響.....	19
2. 海洋深層水對卵巢切除大白鼠骨結構之影響.....	19
3. 海洋深層水增加卵巢切除大白鼠骨組織中 ALP 之表現量.....	19
4. 海洋深層水增加卵巢切除大白鼠骨組織中 RUNX2 之表現量.....	20
5. 海洋深層水增加卵巢切除大白鼠之骨質密度.....	20
6. 海洋深層水增加卵巢切除大白鼠之骨小樑數目.....	20
【細胞實驗】	
1. 硫酸鎂及海洋深層水(60K、40K)處理 MG63 細胞毒性測試.....	21
2. 硫酸鎂及海洋深層水(60K、40K)處理 MG63 細胞後骨質相關蛋白表現	
第六章、討論.....	22
第七章、參考文獻.....	24
第八章、實驗結果圖表.....	30
第九章、附錄.....	41

中文摘要

停經後雌激素分泌降低是骨質疏鬆的主因之一。除了鈣離子外，鎂離子也會促進成骨細胞(ostoblasts)分裂而影響骨質。因此本研究欲探討在飲食中補充鎂，是否有助於骨質疏鬆的延緩。我們以卵巢切除的 Sprague-Dawley (SD)雌性大白鼠為實驗模式，模擬停經後婦女。給予含高濃度鎂離子之海洋深層水 (鎂 >50,000ppm, Liquid Ocean Minerals(LOM)-50K, Pacific Deep Ocean Biotech)，觀察在伴隨鈣保健品情況下對骨質疏鬆的影響。海洋深層水用量依據衛生福利部的每日鎂離子建議量換算，分別給予 0.35 mL/kg、0.7mL/kg 及 1.4 mL/kg。經 8 週管餵後犧牲，結果發現血清 ALP 在卵巢切除組明顯上升，而給予海洋深層水的組別數值均有降低。以 H&E stain 及 Micro CT 檢查股骨，發現海洋深層水可以增加骨質密度、延緩骨小樑骨質流失及骨質脂肪化的趨勢。在免疫組織染色中發現海洋深層水可以增加骨組織 ALP 及與骨細胞分化調節因子 RUNX2。而合併給予鈣保健品的組別，比僅給予鈣保健品者較有改善骨質疏鬆效用。另外使用人類骨瘤細胞(MG63)處理海洋深層水後，檢查細胞 osteocalcin、osterix、RUNX2、ALP、BMP2 等蛋白的表現以觀察可能的機轉。利用以上方法檢測富含鎂離子的海洋深層水對於骨質疏鬆是否有延緩的效果及可能機制。本研究除了探究海洋深層水是否有助延緩於骨質疏鬆外，並期待未來應用於臨床實務以及保健食品的開發。

關鍵字: 骨質疏鬆、鎂離子、海洋深層水、卵巢去除、骨質密度。

英文摘要

After menopause, decreased estrogen secretion is one of the main causes of osteoporosis. In addition to calcium ions, magnesium ions also promote osteoblasts division and affect bone metabolism. Therefore, this study to explore that whether the dietary supplementation of magnesium, is conducive to improve osteoporosis. We used ovariectomized Sprague-Dawley (SD) female rats as model to simulate postmenopausal women. Treat with deep ocean water ($Mg^{2+} > 50,000$ ppm, Liquid Ocean Minerals (LOM)-50K, Pacific Deep Ocean Biotech) containing high concentrations of magnesium ions and observe the effect of deep ocean water combine with calcium supplement on osteoporosis model. The amount of deep ocean water is 0.35 mL / kg, 0.7 mL / kg and 1.4 mL / kg, respectively, based on the daily recommended amount of magnesium in the Ministry of Health and Welfare. After 8 weeks of tube feeding to sacrifice, the results found that serum ALP in the ovariectomy group was significantly increased, and the values of deep ocean water groups were reduced. We found that treat with deep ocean water groups in H & E stain and Micro CT examination of the femur, bone density is increased, bone trabecula bone loss and adipogenesis in bone are decreased. In the immunohistochemical staining, increased the bone tissue ALP and the osteoblast differentiation regulator RUNX2 in deep ocean water groups. The effect of improving osteoporosis, deep ocean water combine with calcium supplement are more effective than only with calcium supplement. In addition, using human osteosarcoma cells (MG63) to treat with deep ocean water, check the protein performance, such as osteocalcin, osterix, RUNX2, ALP, BMP2 and observe the possible pathway. Through the above method to detect magnesium ions rich in deep ocean water for improving osteoporosis and possible mechanism. In addition to exploring whether deep ocean water is helpful in osteoporosis, we expect that it will be used in clinical care and functional food development in the future.

Keywords: ovariectomy, Osteoporosis, Magnesium ion, Deep ocean water, Bone density.

第一章、序論

骨質疏鬆 (osteoporosis)在美國，統計大約有四千四百萬位罹患者。放眼全球，則估計有兩億人口遭受其影響¹。根據衛生福利部國民健康署 104 年 10 月更新的資料顯示，國內女性在停經後每 4 人有 1 人罹患骨質疏鬆，約有 96 萬停經婦女受其威脅。顯然骨質疏鬆症已成為值得關注的公共健康問題之一²。骨質疏鬆大致可分為老年性以及停經後的骨質疏鬆這兩大類。其中，停經後之骨質疏鬆，是因雌激素分泌的降低，增加骨質的代謝(bone remodeling)，由於骨質形成不平衡，而引起骨質流失，使得鈣質由骨質釋放到血液中，造成鈣、磷濃度的增加。尿鈣排出量提高以及降低腸道吸收鈣，最後形成骨質疏鬆的現象。一般認為多攝取鈣質有利於骨質疏鬆症，然而研究指出，在鈣平均攝取量高的國家，罹患骨質疏鬆的機率卻未見降低。即使飲食中鈣質攝取量多，並不表示體內可以完全保有，仍需要其他離子，例如鎂來協助骨鈣沉積^{3,4}。鎂在骨骼代謝中，其促進成骨細胞(osteoblasts)的細胞分裂(mitosis)，影響骨質代謝。

(一)骨骼組織

骨骼為一種緊密結實的結締組織，是由多種細胞與大量礦物化的細胞外基質所構成。人體骨骼外層由較為緊密的皮質骨(cortical bone)又稱緻密骨以及內層較為鬆軟的海綿骨(cancellous bone)所組成。成人骨骼中海綿骨約佔 20%，緻密骨為 80%。緻密骨質地堅硬，其內部呈現許多同心圓排列，內含有中空管路稱為哈氏系統(Haversian system)，內有淋巴、血管以及神經組織。海綿骨內部由許多骨小樑(trabecular bone)所構成質地則較為鬆散，骨小樑之間有許多孔隙其形狀類似海綿狀，因此又稱之為海綿骨或是小樑骨。

骨骼中主要含有三種細胞:成骨細胞(osteoblasts)、蝕骨細胞(osteoclasts)與骨細胞(osteocytes)。

(1) 成骨細胞(osteoblasts):

成骨細胞(osteoblast)負責骨質形成作用。經由分泌合成類骨質(osteoid)與骨骼表面相連接，並使骨基質進行礦化生成骨質。成骨細胞是由骨髓基質幹細胞(mesenchymal stem cells)分化而來⁵。當其活化時，內部會出現較大的高基氏體、大量內質網以及游離核苷酸，因此具備高度蛋白質合成能力，是形成骨骼以及細胞外基質第一型膠原蛋白的主要細胞⁶。

(2) 蝕骨細胞(osteoclasts)

蝕骨細胞負責骨骼溶蝕作用。與巨噬細胞皆由造血前驅細胞(hematopoietic progenitor)分化而來，由不同的刺激因子作用下，分化為不同的細胞。其中蝕骨細胞可經由 RANKL(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)、M-CSF (macrophage colony-stimulating factor)、IL-1(interleukin-1)等因子刺激，先分化為單核蝕骨細胞(Mono-nuclear osteoclasts)再透過 DC-STAMP (dendritic cell-specific transmembrane protein) 以及 OC-STAMP (osteoclast stimulatory transmembrane protein)進行融合，成為多核蝕骨細胞(multi-nuclear osteoclasts)，最

後形成成熟的蝕骨細胞⁷。其會分泌出 metalloproteinase 9(MMP9)、Cathepsin K(cat K)以及分泌氫離子酸化細胞外基質等方式，達到溶蝕骨質的作用⁸。

(3) 骨細胞(osteocytes)

成骨細胞(osteoblasts)可分為活化與休止兩種狀態。其中當成骨細胞處在休止狀態時，會被包裹於已礦物化的骨小窩(lacuna)當中，轉成骨細胞。成熟的骨細胞會分泌 Scelerostin 蛋白來保持抑制骨質形成的狀態，即不再進行骨質生成，藉此來調節成骨細胞的活性。當骨細胞受到機械壓力時，會停止分泌 Scelerostin 蛋白，骨質的生成便由骨表面開始進行^{1,9}。

骨細胞外基質分子(extracellular matrix molecules)

建構骨骼的基本材料有膠原蛋白(collagen)、非膠原類蛋白(non collagenous proteins)、黏多醣類(mucopolysaccharides)、鈣碳酸鹽(calcium carbonate)、鈣磷酸鹽(calcium phosphate)、以及水分等成分。鈣碳酸鹽與鈣磷酸鹽約占骨骼重量的60-70%，這些礦物質提供骨骼硬度以及強度；膠原蛋白則是使骨骼具有彈性與張力¹⁰。其中細胞外基質的重要成分，說明如下：

(1) 鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)

ALP 是一種附著於骨細胞膜上的醣蛋白。為成骨細胞所分泌之酵素，有利骨質礦物化。可以做為完全分化之成骨細胞表面早期發現的表現指標。ALP 被認為是可以起始骨細胞外基質的礦物化。

(2) Osteonectin/Osteopontin

Osteonectin 與 Osteopontin 皆是磷酸化醣蛋白，呈現酸性。前者可與第一型膠原蛋白做結合，並可黏附游離的鈣離子與氫氧磷灰石結合。於骨質分化過程中，osteonectin 能調節細胞與細胞外基質間的相互作用。Osteopontin 可以將骨骼內部的有機與無機基質做連結，使組織具有黏附能力。因此，對於骨骼生成以及重塑(remodeling) Osteonectin 與 Osteopontin 是其中重要的一環。

(3) 第一型膠原蛋白(Type I collagen)

構成骨骼的膠原蛋白主要由成骨細胞分泌，其中第一型膠原蛋白占 95%，是骨質細胞外基質主要成分，亦為組成結締組織重要的蛋白質，其他尚有第三型、第四型以及第五型膠原蛋白。第一型膠原蛋白是由兩個 $\alpha 1$ 鏈和 $\alpha 2$ 鏈組成三股螺旋(triple-helix)形式，並藉由 ALP 等媒介參與骨質礦物化過程。當蝕骨細胞作用，會將第一型膠原蛋白分解，其三股螺旋交互連接的分子:pyridinium 與 hydroxyproline 會釋出。而膠原蛋白兩端非三股螺旋處會分解為碳端第一型膠原蛋白片斷(C-telopeptide of type I collagen,CTX)以及氮端第一型膠原蛋白片斷(N-telopeptide of type I collagen cross-linked region,NTX)^{11,12}。

(4) Osteocalcin

Osteocalcin 是骨骼內細胞外基質非膠原蛋白中含量最多者，約占 1-2%，亦稱為 Bone Gla Protein, BGP。由成骨細胞合成，透由三個 Gla 與氫氧磷灰石結合，代表骨質礦物化。其在合成過程中，會因為在進入基質時有部分片斷被釋放到血液，故可檢測血清中 Osteocalcin 濃度作為骨質生成的指標。

這些骨細胞外基質統稱為類骨質(osteoid)，參與整個礦物化過程從開始堆積鈣離子與磷離子，形成氫氧磷灰石結晶至其成熟。當成骨細胞被礦物化的骨基質所包覆會逐漸分化成骨細胞，並分泌 Osteocalcin 。

(二)骨生成作用(osteogenic)

骨髓中有一部分細胞負責進行血液系統的代謝更新：造血幹細胞(hematopoietic stem cells,HSCs)以及造血前驅細胞(hematopoietic progenitor cells)；另一部分則為骨髓間質細胞(bone marrow stromal cells)又稱為間充質幹細胞(mesenchymal stem cells, MSCs)，可以分化成軟骨母細胞(chondroblasts)、成骨細胞、脂肪細胞(adipocytes)以及纖維母細胞(fibroblasts)等。

骨骼的發育，先由 MSCs 分化為成骨前驅細胞(osteoprogenitor cells)，再分化為前骨母細胞(preosteoblasts)，進一步分化為成熟的骨母細胞(mature osteoblasts)，在此同時細胞會分泌骨基質(bone matrix)，骨母細胞逐漸被基質包裹直到形成最終的骨細胞(osteocytes)¹³。

在 MSCs 分化為成骨細胞的過程中，需藉由不同的荷爾蒙(hormone)、細胞激素(cytokines)與生長因子(growth factor)等刺激因子作調控。舉例而言，維生素 D、副甲狀腺素(PTH)以及雌激素(estrogen)，可以參與成骨細胞的分化以及骨質生成¹⁴。

轉化生長因子 β 家族(transforming growth factors beta family, TGF- β family)、類胰島素生長因子(insulin-like growth factors, IGFs)、血小板衍生生長因子(platelet-derived growth factors)以及纖維母細胞生長因子(fibroblast growth factors)等，可以增強骨質膠原蛋白之合成，並促進成骨細胞的增生。IGFs 還會抑制膠原蛋白裂解酶(基質金屬整合蛋白酶 matrix metalloproteinase, MMP)的合成。TGF- β 亦能誘導蝕骨細胞凋亡而減少骨質溶蝕作用。另外還有一群類似於 TGF- β 的骨型態蛋白(bone morphometric proteins, BMPs)，為骨質生成的誘導因子，具備新骨質合成的能力¹⁵。

最終誘導成骨細胞成熟以及骨質生成的主要途徑，一般被廣為接受的是經典 Wnt 信號途徑(canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway)、骨型態蛋白信號途徑(BMP signaling)與轉錄因子 RUNX2(CBFA1/AML3)¹⁶。

於骨細胞分化過程當中，成骨細胞外觀會由原先的梭狀(spindle shaped)轉化為立方形(cuboidal)，其中亦涉及到基因表現以及細胞外基質的改變。MSCs 先分化為骨前驅細胞，其會表現出 Msh homeobox2(Msx2)基因；隨後接續表現 RUNX2、Osterix(Osx)、distal-less homeobox5(Dlx5)、activator protein1(AP1)基因。在分化為前骨母細胞可被測得細胞外基質，如：ALP、BSP 以及第一型膠原蛋白的產生。最終當分化成為成熟的成骨細胞可以觀察到 osteopontin 與 osteocalcin 的表現¹⁷。

骨相關轉錄因子(bone-related transcription factors):

RUNX2(Runt-related transcription factor 2)是骨分化的轉錄因子，可以透由 Wnt/ β -catenin 與 TGF- β /BMP 訊號途徑所誘導。RUNX2 可與 osteocalcin 5'端啟動

子上的 Osteoblast-Specific Element 2(OSE2)序列結合，來進行下游基因表現的調控，例如:ALP、osteoponin、osteocalcin、collagen、RANKL、OPG 等。除了促進成骨細胞分化成熟之外，也能透過 RUNX2 調控 RANKL 與 OPG，影響蝕骨細胞之分化。早在 1997 年 Komori T. 等人，發現當小鼠缺乏 RUNX2 基因會造成骨生成能力的缺乏，轉而誘導 MSCs 分化成軟骨細胞或是脂肪細胞。可說明 RUNX2 在骨骼發展過程中所佔據的重要性¹⁸。

(三)蝕骨作用(osteoclastogenic)

蝕骨細胞功能在於骨質的溶蝕，其為一種多核細胞，源自於骨髓內血源幹細胞中單核巨噬細胞系統。當受到刺激時，會由單核細胞變為前蝕骨細胞(preosteoclast)，進一步受到刺激而形成多核蝕骨細胞。其中參與的刺激因子，例如:活化維生素 D、macrophage colony-stimulating factor(M-CSF)、PTH、細胞激素等。

成熟蝕骨細胞胞內的胞漿為嗜酸性，且胞漿內富含粒線體、溶酶體以及游離的核糖體。當細胞成熟後會因為黏附因子 $\alpha_v\beta_3$ integrin 的調控而附著於骨質上方，而酸性水解酵素(acid hydrolases)會由高基氏體移至刷狀緣與初級溶小體結合後運送至細胞外骨與細胞間的透明區(clear zone)中釋放。無水碳酸酶 II(carbonic anhydrase II,CAII)將水以及經由細胞呼吸作用所產生的二氧化碳進行催化形成氫離子與重碳酸根離子。氫離子再透過刷狀緣上的腺核苷三磷酸(ATPase)的質子幫浦(proton pump)運送至透明區，使此環境偏酸性。酸性環境有利於酸性水解酵素(如:cysteine proteases(cathepsin K)、carbonic anhydrase II、matrix metalloproteinases(MMPs)、tartrate resistant acid phosphatase(TRAP))與骨質中的無機鹽類進行螯合(chelating)，進行去礦物化解離鈣離子、磷離子，使骨基質瓦解。所分解的殘餘物會經由刷狀緣上的 Fc 接受器透過胞飲作用(endocytosis)進入蝕骨細胞經溶小體作用最終釋放至鄰近的靜脈竇(venous sinusoid)完成溶蝕作用^{19,20,21}。

(四)骨質動態平衡的控制

骨骼進行汰舊換新的過程稱之為 bone remodeling，包括溶蝕作用(bone resorption)與骨骼生成作用 (bone formation)。在正常情況之下，骨骼藉由成骨細胞與蝕骨細胞於骨小樑(trabecular)表面作用，持續進行溶蝕與合成，兩者達到動態平衡，以維持骨骼完整性。倘若此機轉失去平衡，溶蝕作用(bone resorption)大於骨骼生成作用 (bone formation)則會導致骨質(bone mass)流失情形^{22,23}。

成骨細胞不僅進行骨質生成，尚具有調控骨質溶蝕的作用。在蝕骨細胞與成骨細胞靠近時成骨細胞會分泌 TNF- α 、IL-6、RANKL 等刺激蝕骨細胞作用。也會分泌酸性水解酵素 MMPs 參與溶蝕作用。(1)RANKL/RANK 分子機轉

調控蝕骨細胞新生作用(osteoclastogenesis)的機轉為 RANKL/RANK。RANKL 是腫瘤壞死因子(TNF)的成員之一，屬於第二型的穿膜蛋白(membrane protein)，

由成骨細胞所分泌，會影響蝕骨細胞的分化與其功能。RANKL 具備可溶性以及可與細胞膜產生鍵結兩種型態。在骨骼作用方面，RANKL 與蝕骨細胞膜上的 RANK 結合，引起細胞內訊息傳遞，調節蝕骨細胞分化、活化以及抑制凋亡等作用。RANK 則是腫瘤壞死因子受體(tumor necrosis factor receptor;TNFR)的成員之一，為第一型穿膜蛋白。主要表現於蝕骨細胞、T 細胞以及 B 細胞上，為細胞內轉接蛋白之一。當 RANK 與細胞質裡的 TRAF2、TRAF5、TRAF6 相結合，會誘發 JNK、c-Src、NF- κ B 與 PKB 路徑。當 RANKL 與蝕骨細胞上的 RANK 作用，透由 TRAF6 活化 MAPK、PI-3K 與 NF- κ B 路徑，同時在 M-CSF 存在的環境下，一同來調節蝕骨細胞的作用^{24,25}。

(2)Sclerostin/Wnt signaling 分子機轉

Sclerostin/Wnt signaling 分子機轉是維持骨質量平衡的機制，其發生於成骨細胞與骨細胞兩者間，其藉由骨細胞所分泌之 Sclerostin 來進行調控。Sclerostin 在人體是經由染色體 17q12-q21 的 SOST 基因所轉譯的物質，屬於醣蛋白。可與 Wnt signaling 中的 Wnt coreceptors:low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6(LRP5/LRP6)結合，抑制 Wnt signaling，然而 Wnt signaling 是成骨細胞分化所需。若骨骼在沒有承受負重壓力時，會增加 Sclerostin 的分泌，即會抑制 Wnt signaling 使得成骨細胞活性下降，蝕骨細胞活性相對提高，造成骨質的流失^{26,27}。

(五)成骨細胞、蝕骨細胞與脂肪細胞之關係

成骨細胞(osteoblast)與脂肪細胞(marrow adipocytes)來自相同的 mesenchymal progenitor，當脂肪生成(adipogenesis)增加時，會使得造骨細胞(osteoblast)的活性被抑制，導致骨密度(bone mineral density)降低以及骨質流失的情形發生^{28,29}。兩種細胞之間的分化平衡，受到細胞外相關訊息的溝通來調節。也牽涉到接收器(receptor)以及細胞核內轉錄因子之間的合作。涉及相關路徑有：RANKL/RANK/OPG、Wnt/ β -catenin signaling pathway 與 PPAR γ 。藉由活化 PPAR γ ，來促進脂肪細胞之生成並抑制成骨細胞。在骨髓間質細胞(bone marrow stromal cell)中，降低 Wnt 之單一路徑時，會增加脂肪細胞的分化，藉由提升 C/EBP α 與 PPAR γ 之調節作用，而其也透由降低 Runx2 的表現，來抑制成骨細胞之分化。此外，在成骨細胞中 Wnt 之單一路徑活性降低時，會使得 OPG 的表現量下降，在 RANKL/RANK/OPG 之路徑上的 RANKL 會增加，引起蝕骨細胞的分化，導致溶蝕作用(bone resorption)的現象增加，最後形成脂質的沉積並促進骨質疏鬆的發展^{30,31}。(附錄一)

(六)骨質疏鬆症

骨骼發育完全約介於三十至四十歲之間，此階段稱之為「骨質的高峰期(peak bone mass)」，之後便會隨著年齡逐漸走下坡。平均而言，成人每年會有約 2-3% 的緻密骨以及 25% 海綿骨進行汰換舊新。骨骼會不斷溶蝕(resorption)、生成(formation)與重塑(remodeling)，以維持動態平衡。當鈣質由骨骼移向血液，造成

礦物質的流失，使得原本緻密的骨骼形成許多孔隙，呈現中空鬆散的現象，導致骨骼脆弱，即所謂的「骨質疏鬆症」。

骨質疏鬆症對於健康的影響，包含了骨頭因疏鬆而變薄、變脆弱、容易造成骨折，特別是前臂骨、股骨及脊椎骨。骨折所導致的後果，不僅僅增加疾病之發生率，亦提高了死亡率，尤其是髖骨以及脊椎骨骨折，這是被公認的一項事實。不論進入老年期的男性或是女性，在發生低創傷的骨折(low-trauma fractures)，會增加 5-10 年的死亡率，倘若之後再發生骨折的情形，死亡率會再額外提升 5 年³²。於 1993 年世界衛生組織(World Health Organization,WHO)定義骨質疏鬆症為一種全身性的骨骼疾病，會出現骨質量減少、骨骼組織顯微結構變差，骨骼脆弱以及提高骨折的風險。根據 WHO 定義，測定骨質之不同階段以及判斷是否患有骨質疏鬆(osteoporosis)，可以與正常年輕健康女性比較骨密度 bone mineral density (BMD)計算出一種標準數值稱為:T-score 來表示^{33,34}。1. 骨質正常:T-score-1.0 以上(含 1.0); 2. 低骨質密度(low bone mass 或稱 osteopenia):T-score 介於-1.0~-2.5; 3. 骨質疏鬆(osteoporosis):T-score -2.5 以下(含-2.5); 4. 嚴重骨質疏鬆:T-score -2.5 以下(含-2.5)並有骨折的病史。

一、骨質疏鬆主要分為兩大類

(1)原發性骨質疏鬆症

約佔 90%。其又可以再細分成第一型、第二型、幼年型骨質疏鬆症(juvenile osteoporosis)與特異性骨質疏鬆(idiopathic osteoporosis)。其中，第一型為停經後骨質疏鬆症(post-menopausal osteoporosis)，可能與停經後女性荷爾蒙驟然減少導致骨質大量流失相關，流失速度尤其在停經後五年間最為快速，每年約下降 2-3% 甚至會更高。第二型則為老年型的骨質疏鬆症，常見於 70 歲以上的長者。可能原因為活化型維生素 D 合成減少、腸道對鈣質吸收降低以及成骨細胞活性下降等緣故，以致於隨著年齡骨質逐漸流失³⁵。

(2)次發性的骨質疏鬆症

約佔 10%，亦稱之為第三型骨質疏鬆症。由許多因素所導致，例如:營養不良、血液相關疾病、內分泌相關疾病、藥物以及其他疾病所致。其中以類固醇所引起的骨質疏鬆症最為常見。其相關機轉在於: 1. 腸胃道鈣質吸收減少 2. 腎小管在吸收鈣受阻，導致高尿鈣更加促使骨質流失 3. 代償作用使副甲狀腺分泌增加，活化蝕骨細胞增加骨溶蝕作用 4. 類固醇會降低雌激素與抑鈣素作用加速骨質溶蝕；亦會抑制成骨細胞功能，干擾骨質合成作用。以上可能因素最終造成骨質疏鬆症的結果³⁶。

二、造成骨質疏鬆症的危險因子

- 1.有家族遺傳病史者
- 2.性別、年齡:女性骨質密度較男性低，加上停經後失去雌激素的保護，造成骨質流失增加。
- 3.體型:體型較瘦小者。
- 4.種族:亞裔人種、白人骨質密度會比黑人來的低。

5.生活習慣:吸菸、酗酒、缺乏運動、營養不良、咖啡因攝取過量、維生素D不足、蛋白質不足或是過多以及低鈣高鹽飲食者，也是致病的相關因素。

6.性腺功能不足:例如早發性停經。

7.藥物:類固醇、利尿劑、甲狀腺素、抗癲癇藥物、肝素、四環素等藥物。

三、診斷骨質疏鬆的檢測方法

1. X光檢查:常規X光檢測對於骨質密度的監測並不敏銳，直到骨質可能流失將近30%才出現異常。但對於是否發生骨折的診斷仍具有價值性。

2. 血液及尿液檢查:常用的骨骼代謝指標有以下幾項。偵測骨質生成的有血清骨鈣素(osteocalcin)、血清骨骼鹼性磷酸值(bone-specific alkaline phosphates)與血清 procollagen-I C-terminal peptides(PICP)等指標；而骨質溶蝕的指標有:尿液中 hydroxyproline 與膠原相關物質、pyridinoline(Pyr)、deoxypyridinoline(D-Pyr)、N-terminal telopeptide(NTX)、血清中 C-terminal telopeptide of type I collagen(ICTP) 以及 Tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)³⁷。

3. 骨質密度檢測:為最佳診斷早期骨質狀態的方法。

(1)雙能量X光吸收測定儀(Dual Energy X-ray absorptiometry,DEXA):為目前國際所公認之骨質檢測法。用以測量測髖骨、脊椎³⁸。

(2)定量超音波(Quantitative ultrasound,QUS):測量腳踝、手腕。優點是不具放射線、檢測快速、攜帶方便；缺點則是誤差值較大。一般做為篩檢工具使用。

(3)定量電腦斷層法(Quantitative computed tomography):用以測量脊椎，不過其設備體積較龐大，使用方法較複雜。

此外還有其他可以供測量骨質密度的方式:磁振造影(MRI)、單光子測量法(SPA)、雙光子測量法(DPA)、單能X-光測量法(SXA)、中子激活法(NAA)、放射測量法(Radiogrametry)以及康普頓散射法(Compton Scattering)等檢測方式。

原發性骨質疏鬆症佔據了骨質疏鬆症約90%，其中在停經後骨質疏鬆症會較老年型的骨質疏鬆症還要早發生，透過骨密度的檢查，了解骨骼的健康狀況，能夠在早期發現並盡早介入治療。

(七)雌激素與骨質疏鬆症

骨質疏鬆症常見於老年人以及停經後婦女。其中停經後婦女，雖然有許多原因會在此階段導致骨質疏鬆，然而最廣為人知的因素之一是由於缺少了雌激素(estrogen)的保護，使得骨質流失速度相對停經前改變的幅度大為提升^{39,40}。在停經後雌激素不足的狀況之下，原雌激素對於抑制前蝕骨細胞成熟的功能會降低，以致於增加蝕骨細胞活性，增加骨質的代謝。在骨質形成以及重塑作用之調節，estrogen 與 androgen 皆可與他們的接受器(receptor)結合後經由 hormone response element 調節基因的表現，或是接受器與轉錄因子以 protein/protein interaction 的

方式進行基因的調節。雌激素還可以透過提升保護素(osteoprotegerin,OPG)，或是產生轉化生長因子 β (TGF- β)，來抑制蝕骨細胞的活性及形成，誘導其凋亡。於 in vivo 和 in vitro 的研究提及，雌激素抑制成骨細胞、T 細胞以及 B 細胞產生 RANKL⁴¹；雌激素亦刺激蝕骨前驅細胞(osteoclast precursor cells)的細胞凋亡，以及降低其分化，透由減少 c-jun 的活性，來阻斷 RANKL/M-CSF 誘導 AP-1 依賴性轉錄活性。雌激素也可以間接抑制蝕骨作用細胞因子的生成，如 IL-1、IL-6、TNF- α 、前列腺素、M-CSF 等。這些機制可用來說明雌激素對於調節成骨細胞以及蝕骨細胞的作用，對於減少骨質疏鬆發生的原因⁴²。(附錄二)

(八) 鎂離子與骨質的關聯性

骨質的組成包含有機基質相關的磷灰石結晶(crystalline apatitic)。簡單表示其組成為 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 。然而體內，在基質周圍的離子可以競爭交換其上方的離子。因此鈣可被一些二價離子所取代，例如：鎂、鋇、鋇、鋅、鎳、錳、鈷或鉛離子⁵⁶。其中在磷灰石結晶(apatite crystals)以鎂取代鈣可能有延緩骨質疏鬆過程的效果⁵⁷。鎂是身體內重要元素之一，大約 50-60% 鎂存在於骨骼中，鎂離子可以促進成骨細胞(ostoblasts)的細胞分裂(mitosis)，鎂的缺乏會抑制骨細胞的成長⁵⁸。鎂是骨骼成長之重要元素，可促進骨骼鈣的沉積也能幫助調節鈣運輸⁵⁹。(附錄三)

飲食中缺乏鎂亦可能造成骨質疏鬆的風險，鎂缺乏所引起骨質流失之潛在機制包含下列幾項：(1) 藉由胺基酸的刺激，使低鎂提升對於 NMDA receptor 的刺激作用，進而增加 substance P 的釋放。substance P 隨後刺激單核球(monocytes)產生 TNF α 與 IL-1 β 進而活化蝕骨細胞(osteoclasts)。(2) 當鎂流失時，氧化壓力上升，增加氧自由基的形成也會引起蝕骨細胞之溶蝕作用。(3) 成骨細胞形成降低，可能由於其有絲分裂減少，或是因為 PTH 分泌不足，抑或是有或無伴隨 1,25(OH)₂-vitamin D 降低的情形所致。(4) 形成較大、異常的結晶(crystals)，亦可能使骨質脆弱(skeletal fragility)。(5) 維生素 D 與副甲狀腺素(parathyroid hormone)抗性降低⁶⁰。有研究顯示，更年期婦女患有嚴重的骨質疏鬆時，血清中表現鎂離子濃度呈現顯著偏低的情形⁶¹。

(九) 海洋深層水

1. 簡介與來源

海洋深層水是指位於海平面以下深達 500 至 1000 公尺的海水，在世界各海域中持續的循環。與淺層的海水相比，其不僅乾淨(clean)且富含許多礦物質(mineral)成分。本研究動物實驗所使用的海洋深層水 Deep Ocean Water(DOW)，由 Pacific Deep Ocean Biotech 所提供產品型號 LOM-50K，原料來自於太平洋(Pacific Ocean)海平面下深度達 600 公尺的深層海水。(LOM)-50K 的規格中所含鎂離子(Magnesium)大於 50,000ppm，鈣 368ppm，鈉 2800ppm，鉀 1760ppm。

另外，細胞實驗部分則採用(LOM)-60K 及(LOM)-40K 兩種型號與對照組硫酸

鎂(MgSO₄·7H₂O)來做比對，觀察對於細胞抑制情形以及探討相關調控機制。其中(LOM)-60K 成分為鎂離子>60000ppm、鈉離子<3200ppm、鉀離子<3000ppm、鈣離子<300ppm。(LOM)-40 成分為鎂離子>40000ppm、鈉離子<20000ppm、鉀離子>8000ppm、鈣離子<300ppm。

2. 相關研究

2004 年 Mitsuhiro M. 等人研究日本高知縣(Kochi) 室戶岬(Cape Muroto)淺層及深層海水對於預防經飲食誘導引起高脂血症之兔子(rabbits)於動脈粥狀硬化(Atherosclerosis)等影響之差異。淺層與深層海水成分含量分別為，Na⁺:50.2mg/L; 51.3 mg/L、K⁺:19.9 mg/L; 20.0 mg/L、Ca²⁺:99.8 mg/L; 83.5 mg/L、Mg²⁺:237 mg/L; 241 mg/L; Cl⁻:589 mg/L; 473 mg/L; SO₄²⁻:393 mg/L; 454 mg/L; 硬度:1225; 1199(硬度計算公式:Ca(mg/L) x2.5+Mg(mg/L)x4.1)。結果發現血脂相關指標，如低密度脂蛋白(LDL cholesterol)於深層海水組(433.0±40.3 mg/dl)較給予淺層海水組(477.2±25.4 mg/dl)來的低，且具有顯著性(P<0.05)。整體而言，深層海水對於預防高脂血症以及動脈粥狀硬化較淺層海水效果佳⁶²。

2013 年 Byung G H. 等人研究卵巢切除的小鼠(ovariectomized senescence-accelerated mice,OVX-SAMP8)給予四個月的海洋深層水後，對骨質疏鬆症骨質復原的情形。結果發現血清中 ALP 數值降低(P<0.05)，電腦斷層影像骨小樑數目與控制組相比具有增加的趨勢(P<0.05)。將股骨(femurs)及脛骨(tibias)之骨髓細胞(Bone Marrow Cells)分離，取得 Bone marrow stromal cells (BMSCs)，觀察給予海洋深層水的組別，其成骨細胞分化指標，BMP2(bone morphogenetic protein 2)、RUNX2 (runt-related transcription factor 2)、OPN (Osteopontin)與 OCN(Osteocalcin)與控制組對照具有明顯上升趨勢(P<0.05)。說明介入海洋深層水後，可能有改善骨質疏鬆症的效果⁶³。

2013 年 Byung GH. 等人利用高脂飲食所誘導的糖尿病小鼠(high-fat diet (HFD)-induced diabetic C57BL/6J mice)給予以海洋深層水所提取出的礦物質與淡水混合(Balanced Deep-Sea Water,BDSW)，將硬度調整至介於 500-2000 之間。BDSW 可能藉由調節肌肉及肝臟 AMPK 路徑來調節葡萄糖與脂肪相關之代謝、增加肌肉對葡萄糖吸收等方式，來改善葡萄糖耐受不良(glucose intolerance)的現象⁶⁴。

2016 年 Douglas A. Keen 等人研究，分別將學生運動員分配至海洋深層礦物水(deep-ocean mineral water)、山泉水(mountain spring water)以及含糖運動飲料(carbohydrate-based sports drink)這三個組別當中，比較運動後脫水、脫水後復水(rehydration)以及運動表現等項目。運用唾液滲透壓(salivary osmolality)測量復水速度以及最大力矩 (peak torque)來檢測復水後運動表現恢復情形，於海洋深層水組皆較其他兩組復原速度快(P<0.05)⁶⁵。

海洋深層水富含許多礦物質成分，對於生理功能的效用，目前有許多研究在探討，除上述所舉例，尚有研究探討對於高血壓、異位性皮膚炎(atopic eczema/dermatitis syndrome)以及高脂血症等疾病的影響^{66,67}。

第二章、研究動機

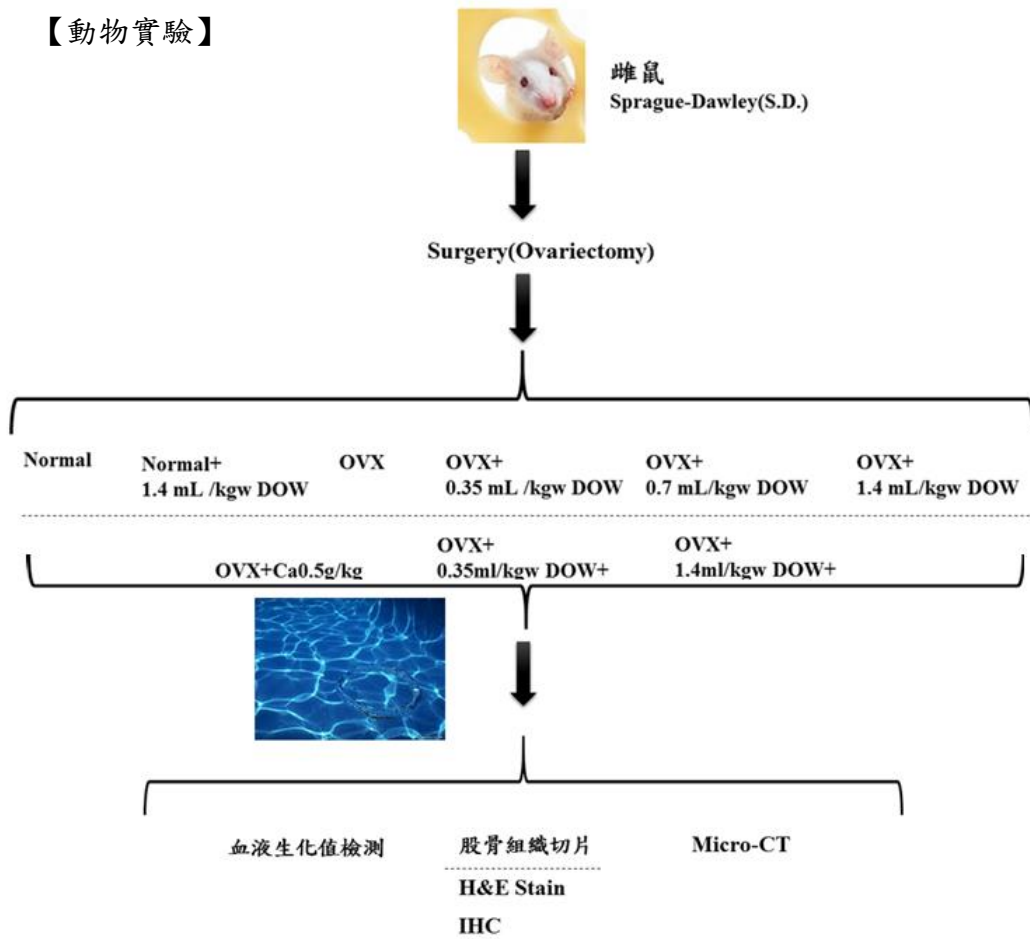
綜觀全球，估計有兩億人口遭受骨質疏鬆的影響，對於公共衛生的問題頗具威脅性。骨質疏鬆症是停經後婦女與老年人重要健康議題之一，雖然其並無明顯臨床症狀，但會因輕微創傷而引發骨折及相關併發症，可能會使病患的生活品質受影響，甚至會有生命危險。依據國民營養健康狀況變遷調查報告(NAHSIT 2004-2008)，針對股骨密度檢查，國內 50 歲以上男性骨鬆盛行率為 10.7%、女性則為 12.1%，若以在腰椎、股骨頸和前臂至少有一部位符合骨質疏鬆症診斷為定義，前述盛行率男性為 22.57%、女性為 41.17%。顯然骨骼相關之健康問題已成為一項值得密切關注的議題之一。

骨質疏鬆屬於多因子影響的疾病(multifactorial disease)，其中飲食對此疾病佔有一部分的影響力。有研究指出，在平均攝取鈣質相對高的國家中，骨質疏鬆發生率卻是偏高。於是我們考慮，是否有其他因素在骨質代謝中，參與其中的調節因素。大約 50-60%的鎂離子存在於骨骼中，其對於骨骼活動扮演重要角色，其可以促進成骨細胞(ostoblasts)的細胞分裂(mitosis)，影響骨質代謝。飲食中缺乏鎂離子亦可能易造成骨質疏鬆的風險之一。

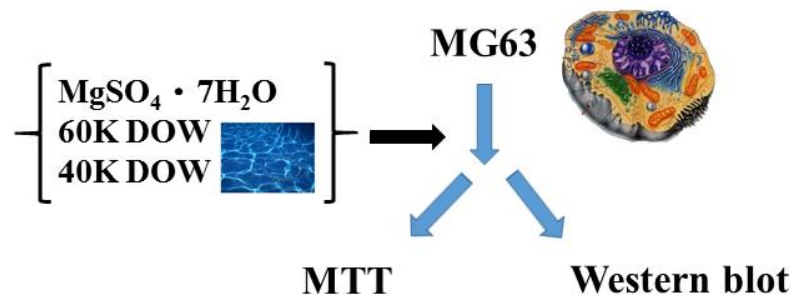
因此，以卵巢切除手術(ovariectomy)模仿更年期婦女，誘導動物缺乏雌激素的保護作用，使骨質去礦物化(skeletal demineralization)，進而形成骨質疏鬆的情形，來進行觀察與實驗。並在實驗中加入海洋深層水，經由飲食中補充鎂，探討是否能夠對於骨質疏鬆有延緩的效果，盼以做為未來臨床的應用以及開發保健食品的市場性，進而促進骨骼相關的健康議題。

第三章、研究架構

【動物實驗】



【細胞實驗】



第四章、實驗材料與方法

(一)實驗材料

抗體	廠商
Anti-ALP antibody(sc-98652)	Santa Cruz
Anti-RUNX2 antibody(ab76956)	Abcam
OSX(Y-21)(sc-133871)	Santa Cruz
Osteocalcin(FL-95)(sc-30045)	Santa Cruz
BMP-2(N-14)(sc-6895)	Santa Cruz
Anti-Goat IgG (A-5420)	Sigma
Anti-Mouse IgG(A-9044)	Sigma
Anti-Rabbit IgG (A-0545)	Sigma
β -Actin (A-5441)	Sigma

藥品與耗材	編號	廠商
APS	D-9542	Sigma
Acrylamide	11049	MDBio
Coomassie blue	-	Kenlor Industries, Inc
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	D2050	Sigma
0.5% EDTA-Trypsin	70213	Gibco
FBS (fetal bovine serum)	26140	Gibco
L-Glutamine	SH30034.01	Thermo
Glycerol	141339	Panreac
Isopropyl alcohol	PS2032-001	Tedia
TEMED	L00847	Alfa Aesar
Nitrocellulose transfer membrane	T02408	PALL
Sodium Bicarbonate	S5761	Sigma
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	151-21-3	Amresco
Thiazoly blue tetrazolium bromide (MTT)	M2128	Sigma
Tris-base	77-86-1	UniRegion Biotech
TWEEN20	P1379	Sigma

儀器	編號	廠商
分光光度計	U3210	Hitachi
CO ₂ 恆溫培養箱	Model 310 series	Thermo

無菌操作台	Class II	Nuaire
水浴槽	SB302	TKS
pipetman	P10-P1000	Gilson
充電型吸管輔助器	Pipet-Aid XP	Drummond
桌上型離心機	2420	Kubota
高速離心機	2K15	Sigma
微量天平	AB104	Mettler Toledo
水平式搖晃器	OS701	TKS
搖擺震盪器	-	TKS
迷你型直立電泳槽	AE-6530 mPAGE	ATTO
電泳轉漬槽	TE77 ECL SemiDry Transfer Unit	Bio-Rad
冷光螢光影像分析系統	LAS-4000	Fujifilm
烘箱	-	Menmert
酸鹼測定儀	6173	Jenco

(二)實驗方法

【動物實驗】

1. 去除卵巢大白鼠動物模式建立

由樂斯科實驗動物中心提供 4-6 週齡(150-175g)，雌性 Sprague-Dawley(S.D) 大白鼠。動物飼養條件為自動光照控制(12 小時白晝、12 小時黑夜)、室溫控制於 25°C、相對濕度 55%，並提供動物自來水及標準大鼠飼料，讓其自由進食及飲水。飼養過程皆遵照中山醫學大學實驗動物照護及使用委員會之規定。

經過一週的適應期後，將動物以 Zoletil 50 (舒泰 50) 腹腔注射(每 100 公克體重 0.2mL)、全身麻醉後進行卵巢摘除，將每隻動物單獨置於一籠待傷口復原，約 10 天後，將海洋深層水以三種劑量 0.35、0.7、1.4 mL/每公斤體重給予動物。鈣保健品(檸檬酸鈣)則依每日飲食建議量換算為動物用量稀釋於適量飲用水中給予。於第九週犧牲取得血液及股骨組織進行分析。

2. 海洋深層水規格

本研究所使用的海洋深層水 Deep Ocean Water(DOW)，由 Pacific Deep Ocean Biotech 所提供產品型號 LOM-50K，原料取自於深度達 600 公尺之太平洋(Pacific Ocean)海水。(LOM)-50K 的規格是以液態形式呈現，其中所含鎂離子(Magnesium)大於 50,000ppm，鈣 368ppm，鈉 2800ppm，鉀 1760ppm⁶⁸。

3. 海洋深層水與鈣保健品劑量換算

依據體重 60kg 之成人，以鎂離子之每日人體建議攝取量除以體重，即可得每公斤體重之建議攝取量。再乘以實驗動物相對於人體之代謝係數，即可得該實驗動物每日之攝取劑量。大白鼠相對於人體之代謝係數為 6.25，小白鼠為 9.01。計算式表示為：大白鼠每公斤體重之攝取劑量 = 人體建議攝取量 / 體重 60kg × 6.25。經由劑量之調整後，低、中、高劑量分別為:0.35ml、0.7ml、1.4ml。

	鎂(mg)	50K海洋深層水劑量(ml)
人體RDA	380	7.6
大鼠劑量/每公斤體重	39.58	0.79167
小鼠劑量/每公克體重	0.04	0.00079
100公克體重大鼠	3.96	0.07917

鈣保健品(檸檬酸鈣)的劑量計算方式與鎂離子相同，以每日建議攝取量 1000mg/60kg 換算成大鼠劑量，計算方式如下：1000mg/60kg × 6.25 × 5(鈣保健品:1/5 為純檸檬酸鈣;4/5 賦形劑) = 500mg/kg。

4. 分組方式

將動物分成九組，每組 10 隻 Rats，如下：

1. 正常組: 餵食正常飲食，不給任何處理。
2. 正常 + 1.4 mL / 每公斤體重海洋深層水: 餵食正常飲食，另管灌 1.4 mL / 每公斤體重海洋深層水。
3. 卵巢切除組(OVX): 切除兩邊卵巢。
4. 低劑量: 切除兩邊卵巢。餵食正常飲食，另管灌 0.35 mL / 每公斤體重海洋深層

水。

5. 中劑量:切除兩邊卵巢。餵食正常飲食，另管灌 0.7 mL/每公斤體重海洋深層水。
6. 高劑量:切除兩邊卵巢。餵食正常飲食，另管灌 1.4 mL/每公斤體重海洋深層水。
7. OVX+ 檸檬酸鈣 0.5g/kg: 切除兩邊卵巢。餵食正常飲食，另管灌 0.5g/每公斤體重檸檬酸鈣。
8. 低劑量+檸檬酸鈣 0.5g/kg:切除兩邊卵巢。餵食正常飲食，另管灌 0.35 mL/每公斤體重海洋深層水以及 0.5g/每公斤體重檸檬酸鈣。
9. 高劑量+檸檬酸鈣 0.5g/kg:切除兩邊卵巢。餵食正常飲食，另管灌 1.4 mL/每公斤體重海洋深層水以及 0.5g/每公斤體重檸檬酸鈣。(實驗結果圖表 Table 1.)

5. 血液生化值分析

採集血液樣品並於離心機中離心 10 分鐘(3000rpm)，取得血清進行檢測。鹼性磷酸酶(Alkaline phosphatase,ALP)為骨質礦物化作用的重要酵素，在骨質的新陳代謝當中，ALP 經由磷酯酵素作用後，釋放到血液中。骨質是一個不斷汰換舊新的組織，在成骨細胞與蝕骨細胞的作用之下，達到一種動態平衡，即當骨質流失情形愈快速，造骨的速度亦會提升。因此可以藉由偵測血液中的 ALP 來做為評估骨質代謝情況，當數值升高時，可表示骨質流失的狀況⁷⁰。

6. 石蠟組織包埋與切片

石蠟組織包埋與切片，可用來觀察細胞組織的型態結構，此法已廣泛應用於許多相關研究領域中。

實驗步驟:

組織以 70% Alcohol 浸泡加以固定 24 小時，接著以序列酒精脫水(dehydration with ethanol)：以 50%, 70%, 80%, 90%, 100% 酒精各一小時後，再 100% 酒精進行隔夜處理。以二甲苯(xylene)置換酒精，浸置 2 小時，隔 1 小時換一次，再以二甲苯隔夜處理後，更換石蠟浸潤以滲透組織。將石蠟完全浸潤的組織置於包埋框中，加入溶化的石蠟靜待冷卻後除去模子，以 5 μ m 的厚度連續切片，置於 38°C 水中使其完全伸展後至於玻片上烘乾。以蘇木紫-伊紅(hematoxylin-eosin 染色法, H&E stain)。將封片膠滴於已染色的組織切片上，以 45°C 慢慢蓋上蓋玻片以避免氣泡產生，待封片膠凝固後即完成封片。

7. 免疫組織染色(Immunohistochemistry,IHC stain)

免疫組織染色是運用免疫學原理中抗體與抗原之間專一性的結合反應，再偵測抗體上方的呈色物質或是螢光物質，來檢測組織或是細胞當中是否有目標抗原。

實驗步驟:

將切片放入烘箱 overnight, 56°C，使臘稍微溶解；回溫後用蠟筆框出檢體位置，並以 Xylene 及酒精進行脫臘程序；用檸檬酸緩衝液(0.01 M, pH6.0)煮沸 15 分鐘後浸泡 5 分鐘 ddH₂O 回溫。之後以 Dual Endogenous Enzyme Block 覆蓋檢

體作用 5-10 分鐘，分別以 ddH₂O 及 PBST 沖洗，然後加入一次抗體完全覆蓋檢體，於 4°C 作用 1 小時。以 PBST 沿著玻片沖洗後加入 Labelled polymer(二抗)覆蓋檢體 30 分鐘，PBST 沖洗後加呈色劑 DAB (1ml buffered substrate+ 1 drop DAB)呈色。利用蘇木紫(Hematoxylin)作對比染色，將載玻片置於濾紙片上，滴上封面膠於檢體上，再用蓋玻片以 45 度角覆蓋在檢體上，藉由毛細現象使封面膠佈滿，避免氣泡產生。等封片膠凝固，即完成封片。

8. 電腦斷層掃描影像(Micro computed tomography, Micro CT)

將動物大腿骨檢體置於 70%酒精保存，送至台灣小鼠診所-國家綜合小鼠表現型暨藥效分析中心(Taiwan Mouse Clinic-National Phenotyping And Drug Testing Center)進行骨密度檢查及攝影。電腦斷層掃描是利用 x 射線由不同角度進行掃描。x 射線穿透不同組織時，會造成不同的衰減，利用偵測器測得衰減 x 射線的訊號，再將此訊號輸入至電腦，藉由電腦程式運算後，累積二維的影像資訊，進一步組合成三維的立體影像，即可建立出被掃描部分的切面影像。

9. 統計分析(Statistical analysis)

研究結果之統計數據，以平均值(means)±標準差(SD)表示。統計方法採用變異數分析 (analysis of variance, ANOVA)比較各組之間差異趨勢，並以 student's t-test 進行各組間差異性比較。當 P<0.05 表示兩者之間具有顯著性。實驗分析軟體使用 SigmaPlot12.5、SigmaStat10 software 進行數據分析。

【細胞實驗】

1. 細胞培養 (Cell culture)

將 MG-63(human osteosarcoma cell)人類骨瘤細胞培養於 pH7.2-7.4 之培養液中，其中含有 10 % fetal bovine serum (FBS)、3 g/L sodium bicarbonate、1 mM penicillin/streptomycin (PS)、4 mM L-glutamine 及 1% non-essential amino acid。所有細胞均培養在維持 5% CO₂、37°C 的恆溫環境。依細胞生長速度而定，更換培養液的時間及次數，原則上每 2 天更換一次。

2. 繼代培養 (Subculture)

待細胞長至八~九分滿時，移除舊的培養液，以 PBS 清洗後加入 trypsin-EDTA 複蓋所有細胞，在 37°C 培養箱中靜置 5 分鐘後，加入含有 10 % FBS 的培養液終止 trypsin 的活性將細胞移至離心管中離心 (1000 rpm, 5 min)，去除上清液，以新鮮含有 10 % FBS 的培養液將細胞打散並繼續培養。

3. 細胞毒性試驗 (Cytotoxicity assay)

本實驗是用於測試細胞對於海洋深層水(60K、40K)以及硫酸鎂(MgSO₄·7H₂O)當中所含鎂離子之敏感性如何，以決定後續細胞實驗所選用之劑量濃度。其原理是活性的活細胞會將 MTT (thiazolyl blue) 經由粒線體中 dehydrogenase 作用代謝還原為藍紫色結晶，之後再以異丙醇將結晶溶出，並於波長 563 nm 下測定溶液吸光值變化，由吸光值的大小可得知存活的細胞數目之多寡，而死細胞是無法進行此作用，因此若溶液的吸光值有降低的話，表示

細胞有死亡或無法代謝 MTT reagent 的情形。將 MG-63(人類骨瘤細胞) (1×10^5 cell/well) 培養於 24 well 培養皿中，以 medium 加入不同濃度的海洋深層水(60K:0,60,300,600,1500,3000,6000ppm/m L) (40K:0,40,200,400,1000,2000,4000ppm/m L)以及硫酸鎂($MgSO_4 \cdot 7H_2O$:0,0.1,0.5,1,2.5,5,10m M) 處理 24 小時，最後以 PBS 清洗再加入培養基含 MTT 試劑 (0.5 mg/mL) 混合反應 4 小時，移除後再加入異丙醇將結晶溶出，在 OD 563 nm 下測吸光值變化。

4. 西方墨點法 (Western blotting)

I. 蛋白質抗原 (cell lysate)之製備

選定以海洋深層水 60K(600ppm)、40K(400ppm)以及硫酸鎂(1m M)處理的細胞進行實驗，經處理 24 小時後收細胞。將培養皿內培養液移除，以 PBS 沖洗，加入細胞溶解緩衝液(RIPA buffer)，及蛋白質水解酶抑制劑，再以細胞刮勺將細胞從培養盤刮下，在 4 °C 下震盪 1 小時，4°C 高速離心 12,000rpm，10 分鐘，吸取上清液到新的微量離心管中，儲存在-20°C。蛋白樣本前處理為取定量之 whole cell lysate，加水補至固定體積，然後再加入 5 倍追蹤染劑 (loading dye)，混合均勻，以 100°C 加熱 10 分鐘，再置於冰上冷卻即可。

II. 蛋白質定量

利用 coomassie brilliant blue G-250 會和蛋白質結合成藍色之複合物，於波長 595 nm 下有一較大之吸光值，以此定量蛋白質。首先以 BSA (bovine serum albumin) 為蛋白質標準溶液，換算樣本細胞萃取液之蛋白質濃度。取 30 μ L 細胞萃取液加入 1 mL 的 coomassie blue，在室溫下反應 10 分鐘，於波長 595 nm 下測定吸光值變化。

III. 鑄膠

將玻璃已去離子水及酒精清洗乾淨擦乾後，裝上膠條並以膠夾將兩片玻璃夾緊。SDS-PAGE 分成兩層膠 stacking gel 及 separating gel，首先先配置 separating gel，若欲做小分子量(30- 100 kD)之蛋白，則配置 10-12%的下層 separating gel；若做大分子量(>100 kD)蛋白，則配製 6-8% 的 separating gel。配膠所需物質混合均勻後，直到液面離 well 約 1.5 公分處為止，加入二次水覆蓋液面，待膠體凝固後，將上層的二次水吸乾，再配 35 置上層 stacking gel 倒入，將電泳齒梳插入電泳片之 stacking gel 中，若有氣泡則上下移動齒梳，使氣泡脫離 stacking gel，待上層膠凝固後，抽出齒梳，用二次水清洗 well 數次，再將配好之整組電泳玻璃膠體，置入電泳槽中，準備將樣品加到 well 中。

IV. 蛋白質電泳(SDS-PAGE)

SDS-PAGE 可將蛋白質依其分子量的不同而分離，首先將電泳液(running buffer；0.124 M Tris、1 M glycine、17 M SDS) 倒入電泳槽內槽中，再把處理好之蛋白質樣本小心注入 well 中，勿使樣本溢出 well，其中一個 well 注入 protein standard marker，樣品 loading 完後，持續加入電泳液直到蓋過最內側

之玻璃上緣；外槽也以電泳液補至蓋過電導線為止。連接電泳槽與電源供應器，打開電源，先以 100 伏特的電壓跑過 stacking gel，直至色帶跑至 stacking gel 與 separating gel 之交界處，再調整電壓為 140 伏特，當色帶跑至底線時才停止電泳。

V. 蛋白質樣本之轉漬 (electrotransfer)

電泳完畢後將膠體取出，截去多餘之部份，將膠體置於兩張經轉漬液 (transfer buffer) 潤濕過的濾紙上，膠體上面再放 36 上與膠體大小相同之硝化纖維膜(Nitrocellulose membrane；NC membrane。硝化纖維膜也需事先經轉漬液浸濕)，再放上兩張經轉漬液浸濕過的濾紙，並用玻璃棒趕走夾在其中的氣泡，最後再以夾板(內含海綿襯墊)夾緊，放入轉漬槽中，同時要將轉漬槽放在冰上，以固定 400 mA 轉漬 4 個小時(10-12% 之膠片)；400 mA 轉漬 3 個小時(6-8% 之膠片)。

VI. 免疫墨點法 (immunoblotting)

轉漬完後將硝化纖維膜用 ponceau S 染色，檢測蛋白是否轉漬成功，比對後 protein marker 剪下所需的分子量，用 TBStween 20 漂洗數分鐘，再以 5% blocking buffer 於室溫下 1 小時作用。之後，倒掉 blocking buffer，再以 TBS-tween 20 漂洗三次 10 分鐘。換上一級抗體，置於 4 °C 下，作用 12~16 小時，再以 TBS-tween 20 漂洗三次 10 分鐘。接著換上二級抗體，於室溫下溫和作用 1 小時，再以 TBS-tween 20 漂洗三次，每次 10 分鐘。

VII. 壓片

將以接好抗體的硝化纖維膜取出加上 enhanced Chemiluminescent Kit(ECL)進行呈色反應，以 FUJIFILM LAS-4000 冷光儀分析冷光強度。

5. 統計分析

細胞實驗過程每組皆三重複，採用採用 student's t-test 比較不同方式處理下組別間的差異，以 means±SD 表示，當 $p < 0.05$ 以下時表示為統計學上有意義的差異。

第五章、實驗結果

【動物實驗】

大白鼠經卵巢切除手術後，待約 10 天的恢復期。接著進行長達八周以不同劑量之海洋深層水以及檸檬酸鈣的管灌餵食。於第九周犧牲，並採集其血液、股骨等檢體，進行血液生化值檢測、股骨組織切片以及電腦斷層掃描影像等方法來分析，並判讀在介入海洋深層水之後，對於卵巢切除所誘導的骨質疏鬆是否具有延緩之效果。

1. 海洋深層水對卵巢切除大白鼠血液生化之影響

採集大白鼠血液進行生化值分析，檢測項目有 ALP、BUN、CRE、GOT、GPT、鈣離子、鉀離子、鎂離子、鈉離子、磷離子等。其中 ALP 這一項，可做為評估骨質代謝的情形。卵巢切除的組別(OVX)與正常組比較，ALP 增加 79%($P<0.05$)為正常組的 1.8 倍。而給予海洋深層水會使 ALP 降低，由低劑量至高劑量分別與卵巢切除組相較，下降之百分比分別為:89.3%、74.9%、69%。其中以低劑量的效果比較顯著($P<0.05$)。補充檸檬酸鈣的組別也可降低 ALP，與卵巢切除組比對，下降百分比分別為:64.3%、54.6%、89.2%。但若以僅給檸檬酸鈣的組別相比，必須要高劑量海洋深層水合併檸檬酸鈣才具有顯著差異($P<0.05$)。然而數值與僅給低劑量者相近，因此以血液 ALP 調節而言，對骨質疏鬆的緩解效果以給予低劑量海洋深層水較佳。(實驗結果圖表 Table 2.、Figure 1.)

2. 海洋深層水對卵巢切除大白鼠骨結構之影響

大白鼠於實驗實施八周後進行犧牲，取其股骨做冷凍切片，運用 H&E Stain 來觀察骨質變化之情形。在給予卵巢切除後，骨小樑會變得較不連續、厚度變薄，且周圍骨髓會出現白色空泡狀的脂肪細胞，表示骨質密度降低，呈現骨質疏鬆的型態。觀察骨小樑可以發現只要有給予深層水的組別，骨小樑都會變得比卵巢切除組來的粗及完整 (Figure 2. D、E、F、H、I)；而合併檸檬酸鈣及低劑量深層水的組別 (Figure 2. H)比只給予檸檬酸鈣的組別 (Figure 2. G)，在改善骨質疏鬆的作用較佳。至於有無合併給予鈣補充，在組織切片的結果呈現中，似乎差異不大。

除此之外，在骨質流失之處，會由脂肪細胞來取代其位置，而呈現脂肪空泡的形態。我們採用 image-po-plus win32 統計軟體來計數脂肪細胞數量，並經由 SigmaPlot12.5 版進行統計分析，以正常組(Normal)為 100%作為基準與其他組做對照。卵巢切除組與正常組相較其脂肪化程度上升 145.3%且具有統計上的意義 $P<0.05$ 。在給予低劑量 0.35ml+檸檬酸鈣 0.5g/kg (LC)的組別，與卵巢切除組相較，其脂肪化程度減少 95%且具有顯著性($p<0.05$)，表示對於脂肪化程度有改善之效果。雖然各組分別施予不同劑量之海洋深層水之後，脂肪化程度有降低的趨勢，不過不具有統計上的顯著性。(實驗結果圖表 Figure 2.)

3. 海洋深層水增加卵巢切除大白鼠骨組織中 ALP 之表現量

ALP 是一種附著於骨細胞膜上的醣蛋白，是由骨細胞分泌以利骨質鈣化的進行。利用免疫組織染色(Immunohistochemistry,IHC stain)法，觀察 ALP 蛋白表

現量，呈現棕色部分為其位置所在。當骨質疏鬆時，骨組織中成骨細胞的 ALP 會有下降的趨勢。觀察免疫組織染色切片，可見卵巢切除組(Figure 3.C)與正常組(Figure 3.A)相較，於骨組織中成骨細胞的 ALP 有下降的趨勢。介入海洋深層水後，ALP 有增加的現象。

以正常組(Normal)為 100%作為標準與其他組別做比較。經由統計分析後的結果，骨細胞 ALP 蛋白表現量與免疫組織染色切片對照相同之處在於卵巢切除組(OVX)與正常組(N)相較，同樣有 ALP 有下降的趨勢。然而具有 ALP 上升的趨勢顯著者，是以施予低劑量、OVX+ 檸檬酸鈣 0.5g/kg 以及低劑量+檸檬酸鈣 0.5g/kg 這三組($p < 0.05$)。其與卵巢切除組相比分別上升 29.5%、20.8%、40.6%。(實驗結果圖表 Figure 3.)

4. 海洋深層水增加卵巢切除大白鼠骨組織中 RUNX2 之表現量

RUNX2 是成骨細胞在分化過程中，重要的轉錄因子。利用股骨之免疫組織染色切片，來觀察 RUNX2 蛋白之表現量。在卵巢切除組，RUNX2 的表現量會下降，而給予深層水時則呈現增加的状态。正常組 (Figure 4.A)的 RUNX2 蛋白可以清楚觀察到，與其他卵巢切除的組別有明顯差異。而在施予海洋深層水之組別中，與誘導組(Figure 4.C)相比，其 RUNX2 之蛋白，有增加的情形。

利用 image-po-plus win32 統計軟體，進行 RUNX2 蛋白表現量的計算，再經由 SigmaPlot12.5 版進行統計分析，以正常組(Normal)為 100%為基準作圖。在給予卵巢切除的誘導之下，相較於正常組，RUNX2 蛋白表現量下降 61.3%($P < 0.05$)。給予海洋深層水後，發現於低劑量以及中劑量對於 RUNX2 蛋白表現量有顯著上升趨勢，分別與卵巢切除組相比各增加 9.4%、12.9%($P < 0.05$)。此外，僅單純給予檸檬酸鈣(OVXC)的組別，蛋白量並無顯著增加效果。雖然在高劑量+檸檬酸鈣 0.5g/kg 蛋白表現量有提升的現象，然而經統計分析後，不具有顯著性。(實驗結果圖表 Figure 4.)

5. 海洋深層水增加卵巢切除大白鼠之骨質密度

將犧牲後所採集的股骨檢體，送至台灣小鼠診所進行 Micro-CT 分析骨質密度(Bone Mineral density, BMD)。BMD 為骨組織中 calcium hydroxyapatite (CaHA) 的密度，用以表示骨質密度的情形。利用卵巢切除方式以達到減少骨密度 (Figure 5.C)的效果。在施予不同劑量之海洋深層水 (Figure 5.D、E、F)於電腦斷層影像中似乎具有改善骨質密度之效，即骨密度較卵巢切除組高。此外，僅給予鈣補充，並無法有效改善骨質密度 (Figure 5.G)，需合併深層水及檸檬酸鈣之組別(Figure 5.I)才有改善卵巢切除後之骨密度以及骨小樑減低之效果。雖然影像中顯示施予海洋深層水後，骨質的密度看似有差異，然而經由 SigmaPlot12.5 版進行統計分析所得結果，並不具有統計上的差異性。

6. 海洋深層水增加卵巢切除大白鼠之骨小樑數目

骨小樑 (Trabecular bone, TB) 是骨骼內層形貌類似海綿狀的部分，在卵巢切除誘導骨質疏鬆的模式之下，蝕骨細胞活性大於成骨細胞，使得骨小樑變稀疏、數量減少。相較於正常組(Figure 6. A)，卵巢切除組(Figure 6. C)之骨小樑較為破

碎。於影像中呈現，施予不同劑量之深層水骨小樑的破碎情形可能有獲得改善。其中低劑量組 (Figure 6. D)以及高劑量組 (Figure 6. F)相較於中劑量 (Figure 6. E)較為明顯。然而，僅給予鈣補充，並無法有效改善骨小樑破碎的現象(Figure 6. G)，需合併深層水及檸檬酸鈣之組別(Figure 6. I)才有改善卵巢切除後，骨小樑破碎減少之效果。

對照 Figure 6. 雖然影像中在施予海洋深層水後，在低劑量、高劑量上可能有改善骨小樑破碎的情形，然而在進行 SigmaPlot12.5 版統計分析後之結果，並無統計上的顯著性。(實驗結果圖表 Figure 6.、Table 3.)

【細胞實驗】

1. 硫酸鎂及海洋深層水(60K、40K)處理 MG63 細胞毒性測試

利用 MTT assay 觀察 MG63 人類骨瘤細胞對於硫酸鎂及海洋深層水(60K、40K)之敏感度為何，以決定後續細胞試驗所使用之劑量。以不同濃度的海洋深層水(60K:0,60,300,600,1500,3000,6000ppm/mL)(40K:0,40,200,400,1000,2000,4000ppm/mL)以及硫酸鎂(MgSO₄·7H₂O:0,0.1,0.5,1,2.5,5,10mM) 處理 24 小時。由 Figure 7.顯示，給予海洋深層水 60K 及 40K 分別在濃度 1500ppm 及 1000ppm，細胞之致死率與控制組相比達顯著下降，各別為 39.3%及 15.6%。而給予 10m M 硫酸鎂之組別，細胞數下降達顯著性，與控制組比較減少 25%。因此選用海洋深層水 60K 1500ppm 以及 40K1000ppm 作為後續實驗依據。雖然硫酸鎂雖在 10m M 為具有顯著致死細胞之劑量，不過在 1m M 開始似乎已有逐步下降趨勢，因此選用此劑量作為實驗劑量。(Figure 7.)

2. 硫酸鎂及海洋深層水(60K、40K)處理 MG63 細胞後骨質相關蛋白表現

以硫酸鎂(1m M)及海洋深層水(60K: 1500ppm；40K:1000ppm)處理 MG63 人類骨瘤細胞 24 小時。以西方墨點法於 β -Actin 比對之下，測定 RUNX2、ALP、Osterix、Osteocalcin、BMP2 等蛋白。其中，在 40K 海洋深層水處理下 RUNX2 蛋白與控制組對照，其表現量上升 9.4%($p < 0.05$)。ALP 於各組表現量則分別為 16.8%、19.8%、23.3%($p < 0.05$)。而 Osterix、Osteocalcin、BMP2 等蛋白經處理後，蛋白質表現情形雖有變化但不具有統計上顯著性。(Figure 8.)

第六章、討論

骨質疏鬆症是導致老年人及停經後婦女發生骨折的主要原因。世界衛生組織指出，全世界每年至少有 890 萬人因骨質疏鬆而造成骨折。在人類一生中發生手腕關節、髖骨以及脊椎骨折風險介於 30-40%，風險率與冠狀動脈心臟疾病 (coronary heart disease) 接近⁷⁰。由此顯示骨質疏鬆症相關議題之重要性。

其中，在停經後婦女骨質疏鬆機會提高。由於失去雌激素的保護，使原雌激素對於前蝕骨細胞成熟的抑制功能減低，導致蝕骨細胞活性增加，提高了骨質代謝。亦觀察到細胞激素，如白細胞介素(IL-1)、腫瘤壞死因子(TNF)以及 IL-6 等在停經後婦女體內也有增加的現象，會促使蝕骨細胞功能，增加蝕骨作用，進而造成骨質流失甚至骨質疏鬆。

一般常認為多攝取鈣質有利於骨質疏鬆症，然而研究指出，在鈣平均攝取量高的國家，罹患骨質疏鬆的機率卻未見降低。Jan Aaseth 等人研究骨質疏鬆與微量元素之關係，發現雖然鈣攝取量高，但不表示體內保有高鈣狀態，需要鎂來協助調節鈣的運輸。鎂離子對於骨質的作用如促進骨骼鈣的沉積、參與礦物化過程及促進成骨細胞細胞分裂等，於序論中有提及鎂可能影響骨質的相關機制，不過目前為止鎂對於骨質的調節相關機制尚未全然了解⁷¹。先前研究顯示，Rude 等人給予成年小鼠(mouse)低鎂飲食，觀察骨頭以及礦物質的代謝，發現在鎂缺乏所引發的骨質疏鬆，會受到發炎細胞激素(inflammatory cytokines)所影響⁷²。2014 年，Orchard 等人進行前瞻性世代研究(prospective cohort study)觀察 73,684 位停經後婦女，飲食中攝取鎂以及補充劑的情形。在低鎂攝取情況下，髖骨及全身骨骼之骨密度下降與其相關。2015 年，Huang 等人發現患有慢性腎病(CKD)的病人伴隨有糖尿病(diabetes)，呈現較明顯的低血鎂以及骨質疏鬆情形⁷³。

在低鎂的情況下，會引起骨質流失。於是許多研究設法以不同方式介入鎂離子，觀察其對骨質相關代謝的影響。2016 年，He LY 等人採用正常人類成骨細胞(hFOB1.19;ATCC, USA)以不同劑量的鎂離子 1m M、2m M、3m M 以及 24、48 及 72 小時的培養，在高劑量(3m M)及暴露時間最長(72 小時)這一組，其 ALP 活性、osteocalcin 等項目顯著增加(P<0.05)。此研究指出鎂離子誘導成骨細胞活性，是藉由增加細胞之間 Gap junctional intercellular communication(GJIC)來影響成骨細胞的分化及骨質的形成⁷⁴。2013 年，Guoa 等人對於卵巢切除的 Rat，植入生物可分解的鎂合金(biodegradable AZ31 Mg alloy: 成分為 Mg-3%Al-1%Zn (wt.%))，觀察到調節成骨細胞(osteoblasts)的因子:BMP-2(bone morphogenetic protein)在骨組織中表現量增加，促進骨頭形成與降低骨質疏鬆的有害影響⁷⁵。

我們的研究探討卵巢切除大白鼠，給予含高鎂離子的海洋深層水以及是否合併鈣保健品，對於骨質疏鬆延緩的效果。本研究採用卵巢切除手術來模擬停經後骨質疏鬆的模式，藉此使得雌激素減少，蝕骨細胞作用增加，引起股骨及遠端幹骺端之海綿骨疏鬆。在實驗中，發現去除卵巢大白鼠的骨代謝活性提升:1. 血漿中 ALP(alkaline phosphatase)上升。因蝕骨細胞活性增加較成骨細胞來的明顯，因此溶蝕作用占優勢。2. 股骨有明顯骨小樑變薄及稀疏的現象。3. 股骨組織的免

疫組織染色中發現 RUNX2 蛋白減少。4. 觀察股骨切片可以見到卵巢切除組的脂肪空泡明顯增多。先前研究顯示，成骨細胞與脂肪細胞來自同源的骨髓間質幹細胞，經由不同刺激而走向不同的分化命運。其涉及相關路徑為 RANKL/RANK/OPG、Wnt/ β -catenin signaling pathway 和 PPAR γ 。RUNX2 為一種具有多功能控制骨骼發育的轉錄因子，可調節分化軟骨組織及成骨細胞的成熟。依據先前研究指出，當分化為成骨細胞的條件:RUNX2 蛋白減少時，會轉而活化 PPAR γ 轉錄因子，使得骨髓間質幹細胞刺激分化為脂肪細胞。在 RANKL/RANK/OPG 之路徑上也可能透過 RANKL 的增加，引起蝕骨細胞的分化，導致溶蝕作用(bone resorption)的現象增加，最後形成脂質的沉積造成骨質流失的現象。

實驗結果發現，施予海洋深層水後，在檢測骨質疏鬆的指標中有改善的情形。

1. 血液 ALP 數值，在施予海洋深層水(低、中、高劑量)後，有顯著降低其數值，其中以低劑量(L)最明顯。
2. H&E Stain 切片下，脂肪化程度以低劑量加上檸檬酸鈣之組別(LC)，有顯著降低脂肪化之程度。
3. IHC 染色中，ALP 以及 RUNX2 皆以低、中劑量較為顯著，其中 RUNX2 在施予高劑量加檸檬酸鈣的組別也具顯著性。
4. 雖然 Micro-CT 在 BMD 以及 TB 之影像有呈現出改善骨密度以及骨小樑效果，然而在統計上不具有顯著性。

雖然在施予海洋深層水的組別與卵巢切除組相比，於上述之檢驗項目中，具有改善骨質疏鬆的趨勢，然而在不同檢測項目中，呈現顯著性的劑量較不一致；Micro CT 影像中，在介入海洋深層水後似乎具有增加骨密度以及骨小樑的現象，不過在統計上沒有顯著性。我們評估可能需要延長給予海洋深層水時間，或是有其他因素所致，需待進一步實驗釐清。不過整題體而言，海洋深層水仍可能具有延緩骨質疏鬆之效。

第七章、參考文獻

1. Osteoporosis Organizations:
(2016)<http://www.4bonehealth.org/resources/resources/>
2. 衛生福利部國民健康署-慢性病防治:骨質疏鬆(資料更新日期:104年01月26日)
3. Aaseth J, Boivin G, Andersen O, et al. Osteoporosis and trace elements – An overview. *J Trace Elem Med Biol* 26, 2012, 149–152.
4. Freeland-Graves J, Kodama H, Klimis-Zacas D, et al. Trace elements in health and disease: essentiality, toxicity. *J Trace Elem Med Biol* 26, 2012, 149–152.
5. Stavros C M et al. UpToDate. Normal skeletal development and regulation of bone formation and resorption
6. Joana C L et al. OSTEOBLASTS AND BONE FORMATION. -*ACTA REUM PORT.* 2007;32:103-110
7. Miyamoto T. Mechanism Underlying Post-menopausal Osteoporosis: HIF1 α is Required for Osteoclast Activation by Estrogen Deficiency. *Keio J Med.* 2015;64(3):44-7.
8. Song I et al. Regulatory mechanism of NFATc1 in RANKL-induced osteoclast activation. *FEBS Lett.* 2009 Jul 21;583(14):2435-40.
9. David G W et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *The EMBO Journal* (2003) 22, 6267-6276
10. Young MF. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2003;14 Suppl 3:S35-42. Epub 2003 Mar 12.
11. Garnero P, Vergnaud P, Hoyle N. Evaluation of a fully automated serum assay for total N-terminal propeptide of type I collagen in postmenopausal osteoporosis. *Clin Chem.* 2008 Jan;54(1):188-96.
12. Garnero P. Bone markers in osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep.* 2009 Sep;7(3):84-90.
13. Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port.* 2007 Apr-Jun;32(2):103-10.
14. Huang X, Zhu B, Wang X. Three-dimensional co-culture of mesenchymal stromal cells and differentiated osteoblasts on human bio-derived bone scaffolds supports active multi-lineage hematopoiesis in vitro: Functional implication of the biomimetic HSC niche. *Int J Mol Med.* 2016 Oct;38(4):1141-51.
15. Wu M, Chen G, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.* 2016 Apr 26;4:16009.
16. Yan-Qiu Liu, Zhi-Lai Hong, Li-Bin Zhan, et al. Wedelolactone enhances osteoblastogenesis by regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway but suppresses

- osteoclastogenesis by NF- κ B/c-fos/NFATc1 pathway. *Sci Rep.* 2016; 6: 32260.
17. Liu TM, Lee EH. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013 Jun;19(3):254-63.
 18. Enomoto H, Shiojiri S, Hoshi K. Induction of osteoclast differentiation by Runx2 through receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and osteoprotegerin regulation and partial rescue of osteoclastogenesis in Runx2^{-/-} mice by RANKL transgene. *J Biol Chem.* 2003 Jun 27;278(26):23971-7
 19. Lianping Xing, Yan Xiu, Brendan F Boyce. Osteoclast fusion and regulation by RANKL-dependent and independent factors. *World J Orthop.* 2012 Dec 18; 3(12): 212–222.
 20. Segovia-Silvestre T, Neutzsky-Wulff AV, Sorensen MG, et al. Advances in osteoclast biology resulting from the study of osteopetrotic mutations. *Hum Genet.* 2009 Jan;124(6):561-77.
 21. Henriksen K, Bollerslev J, Everts V. Osteoclast activity and subtypes as a function of physiology and pathology--implications for future treatments of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2011 Feb;32(1):31-63
 22. Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y, et al. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 4,2005,325-8.
 23. Ebeling PR, Eriksen EF, et al. Implications of osteoblast-osteoclast interactions in the management of osteoporosis by antiresorptive agents denosumab and odanacatib epidemiology and pathophysiology. *Curr osteoporos rep* 12, 2014, 98-106
 24. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998 Apr 17;93(2):165-76.
 25. Matsumoto M, Sudo T, Saito T. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):31155-61.
 26. ten Dijke P, Krause C, de Gorter DJ. Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. *J Bone Joint Surg Am.* 2008 Feb;90 Suppl 1:31-5.
 27. Datta HK, Ng WF, Walker JA, et al. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* 2008 May;61(5):577-87
 28. Ali AA, Weinstein RS, Stewart SA, et al. Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology* 146, 2005,1226–1235
 29. Li T, Xijie Y, et al. Lipid metabolism disorders and bone dysfunction-interrelated and mutually regulated (review). *Molecular medicine reports* 12, 2015, 783-794
 30. Lee KS, Kim HJ, Li QL, et al. Runx2 is a common target of transforming growth

- factor b1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol*, 20,2000,8783-8792.
31. Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, et al. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation beata. *Endocrinology* 143,2002,2376–2384
 32. Bliuc D, Nguyen D, Vivienne EM, et al. Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. *JAMA*, 301, 2009, 513-521.
 33. World Health Organization – WHO criteria for diagnosis of osteoporosis <http://www.4bonehealth.org/education/world-health-organization-criteria-diagnosis-osteoporosis/>
 34. Dennis MB, Clifford JR, et al. Postmenopausal osteoporosis. *NEngl J Med* 374, 2016,254-262
 35. Sundeep Khosla. Pathogenesis of Osteoporosis. *Translational Endocrinology & Metabolism*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/TEAM.9781879225718.ch2>
 36. Canalis E, Delany AM. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Jun;966:73-81.
 37. Bettica P, Taylor AK, Talbot J. Clinical performances of galactosyl hydroxylysine, pyridinoline, and deoxypyridinoline in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Feb;81(2):542-6.
 38. A. EL Maghraoui, C. Roux. DXA scanning in clinical practice. *Q J Med* 2008; 101:605–617
 39. Kakei M, Sakae T, Yoshikawa M, et al. Combined effects of estrogen deficiency and cadmium exposure on calcified hard tissues: Animal model relating to itai-itai disease in postmenopausal women. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 89, 2013, 340–347.
 40. WHO: Bone facts by age [archives-4bonehealth.http://www.4bonehealth.org/education-category/age-group/](http://www.4bonehealth.org/education-category/age-group/)
 41. Sundeep K, Merry JO, David G, et al. Estrogen and the skeleton. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 23, 2012, 11
 42. Kousteni S, Han L, Chen JR. Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J Clin Invest*. 2003 Jun;111(11):1651-64.
 43. Jacques E, Rossouw, et al. Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 2002;288(3):321-333.
 44. Hassan, Nahed M, et al. Potent Role of Dietary Phytoestrogen Plants Cultivated in

- Egypt Against Osteoporosis in Ovariectomized Rats. *Australian Journal of Basic & Applied Sciences*;2010, Vol. 4 Issue 2, p359
45. Ki-Chan An. Selective Estrogen Receptor Modulators. *Asian Spine J.* 2016 Aug; 10(4): 787–791.
 46. D'Amelio P, Isaia GC. The use of raloxifene in osteoporosis treatment. *Expert Opin Pharmacother.* 2013 May;14(7):949-56.
 47. 國人膳食營養素參考攝取量第七版(維生素 D 參考攝取量)
 48. Camirand A, Goltzman D, Gupta A, et al. The Role of Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP) in Osteoblast Response to Microgravity: Mechanistic Implications for Osteoporosis Development. *PLoS One.* 2016 Jul 27;11(7)
 49. Rizzoli R, Sigaud A, Azria M. Nasal salmon calcitonin blunts bone microstructure alterations in healthy postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2015 Jan;26(1)
 50. Chesnut CH, Azria M, Silverman S. Salmon calcitonin: a review of current and future therapeutic indications. *Osteoporos Int.* 2008 Apr;19(4):479-91.
 51. Vestergaard P, Schwartz K, Pinholt EM. Risk of atrial fibrillation associated with use of bisphosphonates and other drugs against osteoporosis: a cohort study. *Calcif Tissue Int.* 2010 May;86(5):335-42.
 52. Almeida MM, Nani EP, Teixeira LN, et al. Strontium ranelate increases osteoblast activity. *Tissue Cell.* 2016 Jun;48(3)
 53. Hwang JS, Chen JF, Yang TS. The effects of strontium ranelate in Asian women with postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2008 Nov;83(5):308-14.
 54. Wensel TM, Iranikhah MM, Wilborn TW. Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women. *Pharmacotherapy.* 2011 May;31(5):510-23.
 55. Patrycja S, Dominika G, Dariusz W. Analysis of the dietary factors contributing to the future osteoporosis risk in young Polish women. *Rocz Panstw Zakl Hig* 2016;67(3):279-285
 56. JA Kanis, FA Pitt, et al. The epidemiology of osteoporosis. *Bone* 13,1992, S7–S15
 57. Sojka JE, Weaver CM, et al. Magnesium supplementation and osteoporosis. *Nutr Rev* 53,1995,71–4.
 58. Yue G, Ling R, Chang L, et al. Effect of implantation of biodegradable magnesium alloy on BMP-2 expression in bone of ovariectomized osteoporosis rats. *Materials Science and Engineering: C* 33, 2013, 4470–4474
 59. Robert KR, Helen EG, et al. Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. *J Nutr Biochem* 15, 2004, 710–716.
 60. Tonya SO, Joseph C L, Nora A, et al. Magnesium intake, bone mineral density, and fractures: results from the Women's Health Initiative Observational Study 1–4. *Am J Clin Nutr* 99,2014, 926-933

61. Brodowski J. Levels of ionized magnesium in women with various stages of postmenopausal osteoporosis progression evaluated on the basis of densitometric examinations. *Przeegl Lek.* 57, 2000, 714-6.
62. Mitsuhiro M. Saburo Y. Atsuhide H. et al. Difference between deep seawater and surface seawater in the preventive effect of atherosclerosis. *Biol. Pharm. Bull.* 27(11) 1784—1787 (2004)
63. Hen-YL. Ming-CL. Ming-FW et al. Potential osteoporosis recovery by deep sea water through bone regeneration in SAMP8 mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2013 (2013)*, Article ID 161976, 11 pages
64. Byung GH. Eun JS. Jung-EP. Anti-diabetic effect of balanced deep-sea water and its mode of action in high-fat diet induced diabetic mice. *Mar. Drugs* 2013, 11, 4193-4212
65. Douglas A.K. Eleni C. John P.K. The impact of post-exercise hydration with deep-ocean mineral water on rehydration and exercise performance. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* (2016) 13:17
66. Ming-JS. Pei-YC. Wen-H L et al. Deep sea water modulates blood pressure and exhibits hypolipidemic effects via the AMPK-ACC pathway: An in Vivo Study. *Mar. Drugs* 2013, 11(6), 2183-2202
67. Hataguchi Y. Tai H. Nakajima H. et al. Drinking deep-sea water restores mineral imbalance in atopic eczema/dermatitis syndrome. *Eur J Clin Nutr.* 2005 Sep;59(9):1093-6.
68. Pacific Deep Ocean Biotech: LOM-60K, <http://pdobiotech.com/products/lom-60k/>
69. Kim SK, Lee MH, Rhee MH, et al. Studies on the effects of biomedicinal agents on serum concentration of Ca²⁺, P and ALP activity in osteoporosis-induced rats. *J. Vet. Sci.* 4, 2003, 151-154
70. WHO Scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level. <http://www.who.int/chp/topics/Osteoporosis.pdf>
71. Fatih K. Mahmut M. Musa U.M. et al. Comparison of bone tissue trace-element concentrations and mineral density in osteoporotic femoral neck fractures and osteoarthritis. *Clin Interv Aging.* 2014; 9: 1375–1382.
72. Rude RK, Gruber HE, Wei LY, et al. Magnesium deficiency: effect on bone and mineral metabolism in the mouse. *Calcif Tissue Int* 72, 2003, 32–41
73. Huang JH, Cheng FC, Wu HC, et al. Low magnesium exacerbates osteoporosis in chronic kidney disease patients with diabetes. *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Endocrinology.* Article ID 380247, 2015, 10
74. He LY. Zhang XM. Liu B. et al. Effect of magnesium ion on human osteoblast activity. *Braz J Med Biol Res.* 2016 Jul 4;49(7).

75. Yue G, Ling R, Chang L, et al. Effect of implantation of biodegradable magnesium alloy on BMP-2 expression in bone of ovariectomized osteoporosis rats. *Materials Science and Engineering: C* 33, 2013, 4470–4474

第八章、實驗結果圖表

Group	N	NH	OVX	L	M	H	OVXC	LC	HC
OVX	-	-	+	+	+	+	+	+	+
DOW (mL)	-	1.4	-	0.35	0.7	1.4	-	0.35	1.4
Ca (0.5g/kg)	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Table 1. 分組簡易表格

※OVX(Ovariectomized)卵巢切除；DOW(Deep Ocean Water)海洋深層水；Ca(Calcium):檸檬酸鈣

Group	treatment		Serum test				Serum test				Serum test			
	OVX	深層水(ml)	Ca ₂ (0.5g/kg)	ALP(U/L)	BUN(mg/dl)	CRE(mg/dl)	GOI(U/L)	GPT(U/L)	Ca(mmol/L)	K(mmol/L)	Mg(mmol/L)	Na(mmol/L)	P(mg/dl)	
N	-	-	-	248.9±71.5	24.5±2.3	0.76±0.07	115.4±17.7	63.8±5.2	12.8±0.4	7.0±0.5	3.4±0.2	140.0±1.2	9.7±0.3	
NH	-	1.4	-	131.9±60.2	20.5±2.0	0.84±0.07	103.0±24.7	70.6±14.2	12.0±0.4	6.6±0.6	2.8±0.3	144.1±2.5	6.2±1.0	
OVX	+	-	-	204.6±30.3*	21.6±1.3	0.84±0.07	102.4±13.8	61.5±11.4	12.2±0.4	6.4±0.5	3.1±0.3	143.9±1.5	6.6±0.8	
L	+	0.35	-	102.63±34.56#	24.8±5.9	0.89±0.04	91.9±12.5	60.4±8.4	12.3±0.4	6.5±0.7	2.8±0.2	145.5±2.4	5.8±0.7	
M	+	0.7	-	119.0±26.56#	23.3±3.5	0.80±0.06	93.7±23.0	56.3±15.1	12.0±0.7	6.9±1.2	2.9±0.1	142.0±2.1	7.3±1.0	
H	+	1.4	-	125.8±51.6#	19.3±2.9	0.81±0.11	143.3±107.1	96.3±71.5	12.0±0.6	6.3±1.1	3.0±0.4	144.5±1.8	7.9±0.8	
OVXC	+	-	+	131.1±25.8	17.1±2.7	0.86±0.05	81.9±11.6	77.0±11.4	12.4±0.7	5.8±0.3	2.9±0.3	142.7±1.2	8.0±0.7	
LC	+	0.35	+	142.3±74.2	22.1±1.5	0.89±0.08	114.8±20.9	74.9±8.1	13±0.5	5.5±0.4	2.9±0.3	144.8±1.3	6.6±1.0	
HC	+	1.4	+	102.75±23.1*	18.3±2.0	0.84±0.05	95.1±15.4	58.4±6.8	12.0±0.5	6.6±0.9	2.8±0.4	144.8±1.7	7.0±1.0	

Table 2. 海洋深層水對卵巢切除大白鼠血液生化之影響
 數據以平均值(mean) ±標準差(SD)表示*:與正常組(Normal)比較具有顯著性, P<0.05; #:與卵巢切除組(OVX)比較具有顯著性, P<0.05; +:與OVX+檸檬酸鈣0.5g/kg組(OVXC)相比具有顯著性, P<0.05。

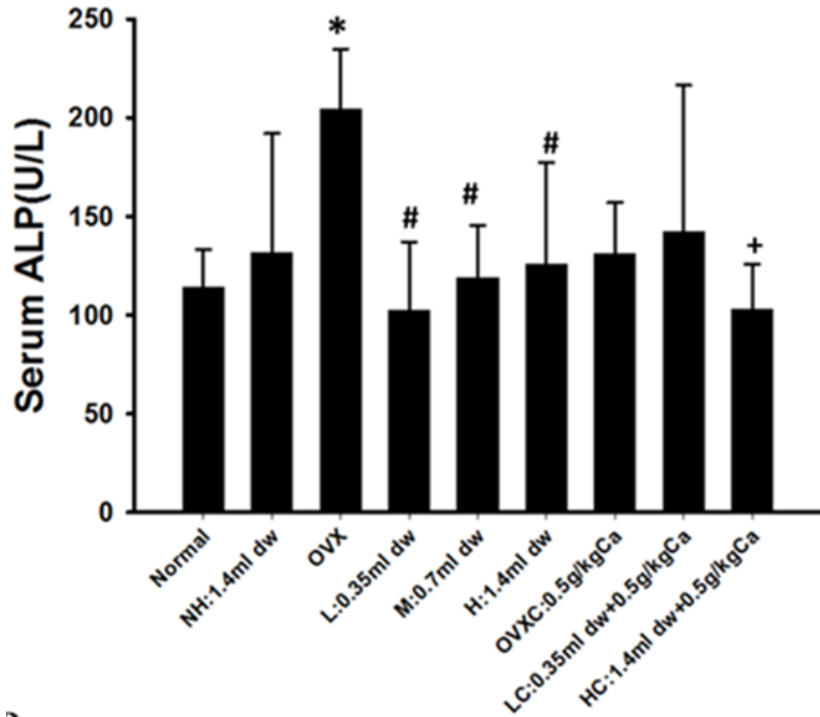


Figure 1. 海洋深層水對血清 ALP 數值的影響

卵巢切除組血清中 ALP 數值明顯上升，在施予海洋深層水後，數值有下降的趨勢。*:與正常組(Normal)比較具有顯著性， $P < 0.05$ ；#:與卵巢切除組(OVX)比較具有顯著性， $P < 0.05$ ；+:與 OVX+ 檸檬酸鈣 0.5g/kg 組(OVXC)相比具有顯著性， $P < 0.05$ 。

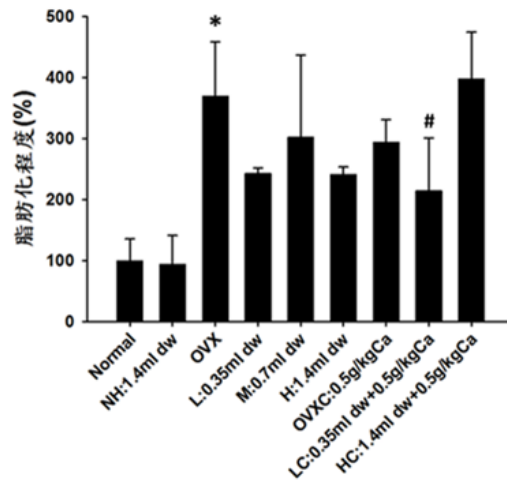
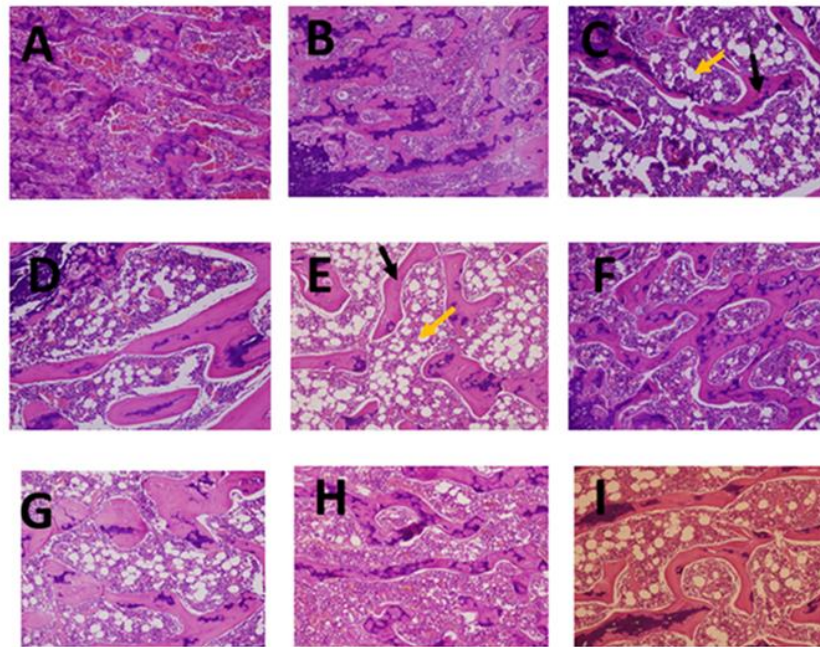


Figure 2. 海洋深層水對卵巢切除大白鼠骨結構之影響

(上圖)顯微鏡下觀察 100 倍放大倍率之 H&E Stain 股骨組織切片，可發現卵巢切除的組別骨小樑較不連續以及脂肪化程度較正常組(A)高。在給予海洋深層水後，脂肪空泡有下降的趨勢。(下圖)脂肪化程度在卵巢切除組為最明顯，給予海洋深層水後有減少的現象。*:與正常組(Normal)比較具有顯著性， $P < 0.05$ ；#:與卵巢切除組(OVX)比較具有顯著性， $P < 0.05$ ；+:與 OVX+ 檸檬酸鈣 0.5g/kg 組(OVXC)相比具有顯著性， $P < 0.05$ 。黑色箭頭所指為骨小樑之位置；黃色箭頭所指為脂肪空泡。A:(N)Normal；B:(NH) Normal+1.4ml(高劑量)；C:(OVX)；D:(L)OVX+0.35ml(低劑量)；E:(M)OVX+0.7ml(中劑量)；F:(H)OVX+1.4ml(高劑量)；G:(OVXC)OVX+檸檬酸鈣 0.5g/kg；H:(LC)0.35ml+檸檬酸鈣 0.5g/kg；I:(HC)1.4ml+檸檬酸鈣 0.5g/kg。

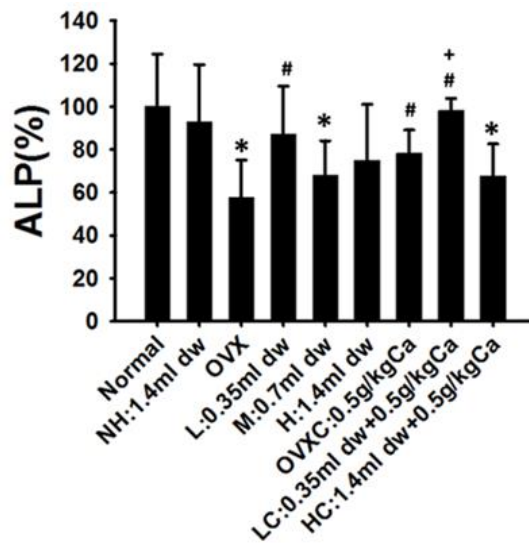
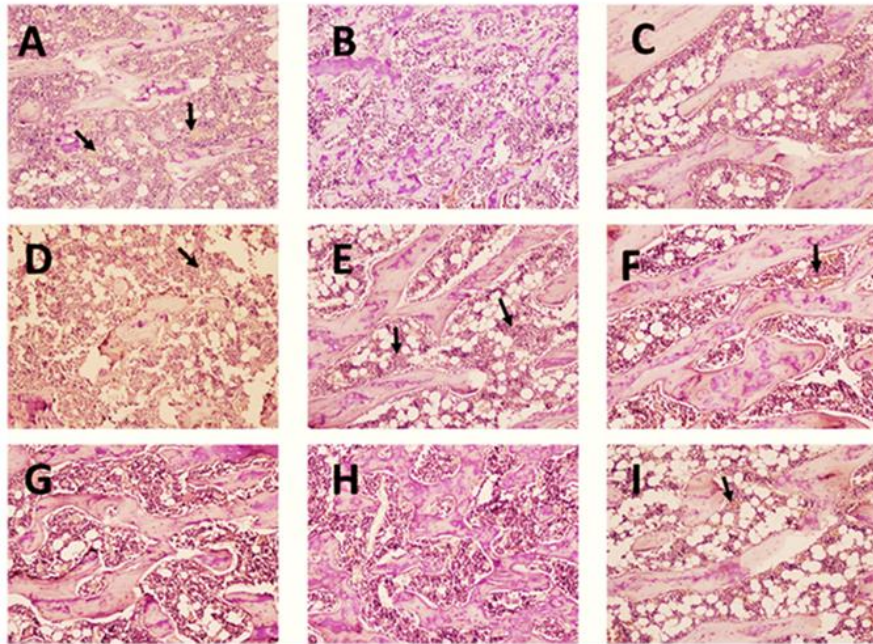


Figure 3. 海洋深層水增加卵巢切除大白鼠骨組織中 ALP 之表現量

(左圖)顯微鏡下觀察 100 倍放大倍率之免疫組織染色(Immunohistochemistry,IHC stain)股骨組織切片，箭頭所指棕色位置為 ALP 蛋白。(右圖)以正常組(Normal)為 100%作為基準值與其他組別比較。*:與正常組(Normal)比較具有顯著性， $P < 0.05$ ；#:與卵巢切除組(OVX)比較具有顯著性， $P < 0.05$ ；+:與 OVX+ 檸檬酸鈣 0.5g/kg 組(OVXC)相比具有顯著性， $P < 0.05$ 。A:(N)Normal；B:(NH) Normal+1.4ml(高劑量)；C:(OVX)；D:(L)OVX+0.35ml(低劑量)；E:(M)OVX+0.7ml(中劑量)；F:(H)OVX+1.4ml(高劑量)；G(OVXC)OVX+檸檬酸鈣 0.5g/kg；H:(LC)0.35ml+檸檬酸鈣 0.5g/kg；I:(HC)1.4ml+檸檬酸鈣 0.5g/kg。

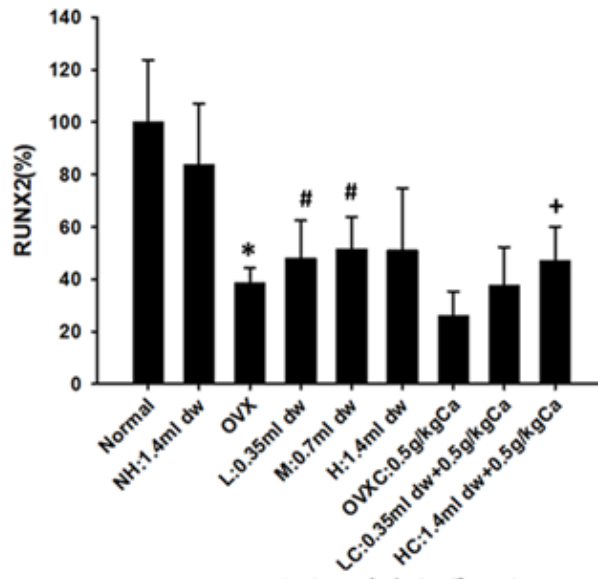
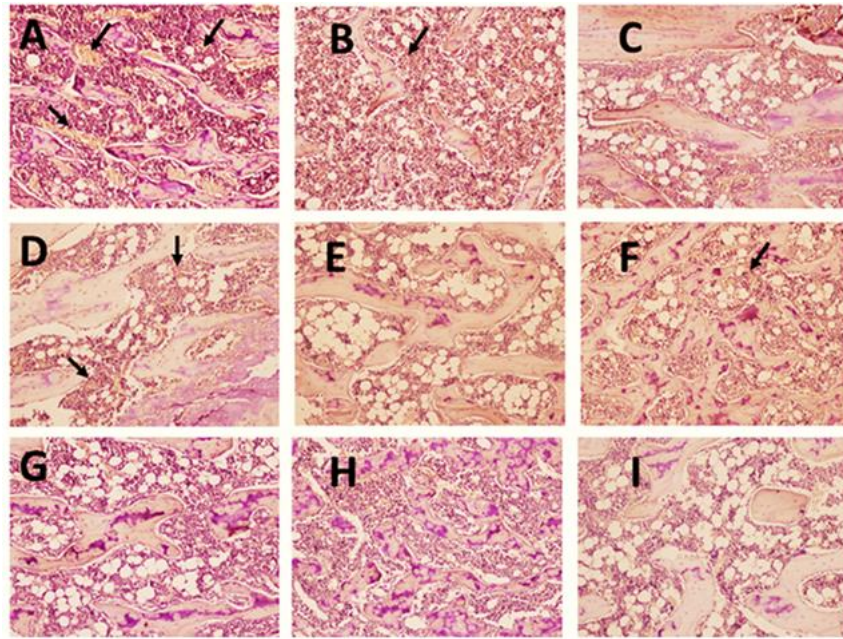


Figure 4. 海洋深層水增加卵巢切除大白鼠骨組織中 RUNX2 之表現量

(左圖)顯微鏡下觀察 100 倍放大倍率之免疫組織染色(Immunohistochemistry,IHC stain)股骨組織切片,箭頭所指棕色位置為 RUNX2 蛋白。(右圖)以正常組(Normal)為 100%作為基準值與其他組別比較。*:與正常組(Normal)比較具有顯著性, $P < 0.05$; #:與卵巢切除組(OVX)比較具有顯著性, $P < 0.05$; +:與 OVX+ 檸檬酸鈣 0.5g/kg 組(OVXC)相比具有顯著性, $P < 0.05$ 。A:(N)Normal; B:(NH)Normal+1.4ml(高劑量); C:(OVX); D:(L)OVX+0.35ml(低劑量); E:(M)OVX+0.7ml(中劑量); F:(H)OVX+1.4ml(高劑量); G(OVXC)OVX+檸檬酸鈣 0.5g/kg; H:(LC)0.35ml+檸檬酸鈣 0.5g/kg; I:(HC)1.4ml+檸檬酸鈣 0.5g/kg。

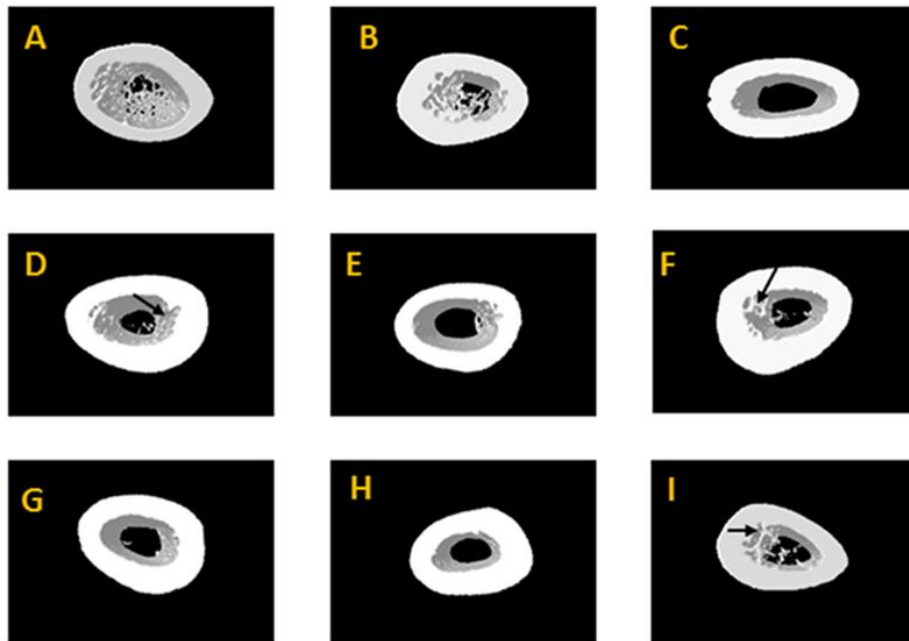


Figure 5. 海洋深層水增加卵巢切除大白鼠之骨質密度

Micro CT 影像，觀察股骨組織骨質密度(Bone mineral density,BMD)。箭頭所指為骨小樑位置。A:(N)Normal；B:(NH) Normal+1.4ml(高劑量)；C:(OVX)；D:(L)OVX+0.35ml(低劑量)；E:(M)OVX+0.7ml(中劑量)；F:(H)OVX+1.4ml(高劑量)；G(OVXC)OVX+檸檬酸鈣 0.5g/kg；H:(LC)0.35ml+檸檬酸鈣 0.5g/kg；I:(HC)1.4ml+檸檬酸鈣 0.5g/kg。

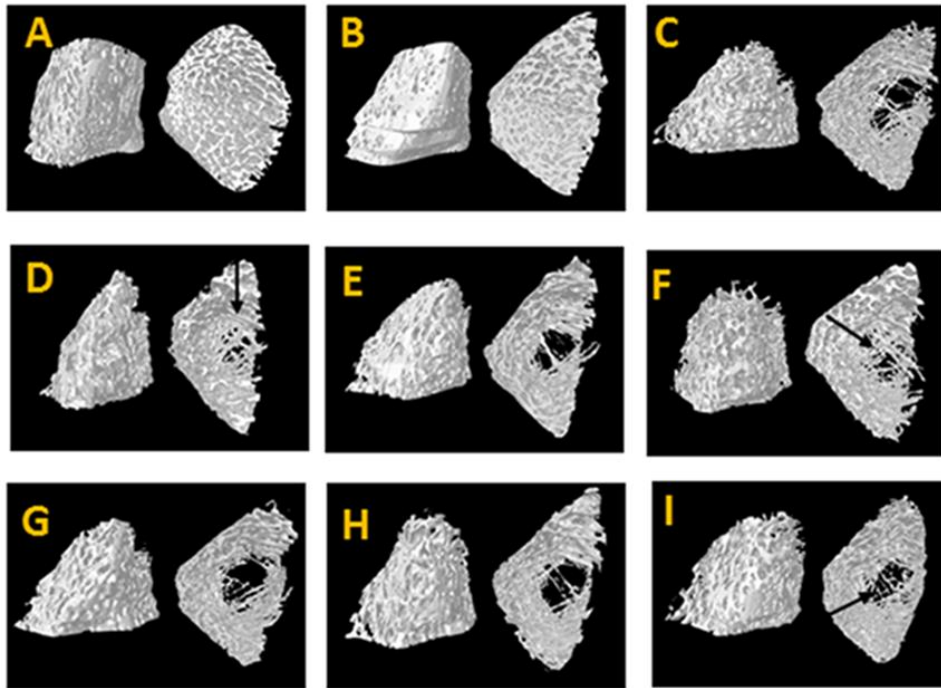


Figure 6. 海洋深層水增加卵巢切除大白鼠之骨小樑數目

Micro CT，呈現骨小樑 3D 影像。箭頭所指為施予海洋深層水後，骨小樑數目增加位置。A:(N)Normal；B:(NH) Normal+1.4ml(高劑量)；C:(OVX)；D:(L)OVX+0.35ml(低劑量)；E:(M)OVX+0.7ml(中劑量)；F:(H)OVX+1.4ml(高劑量)；G:(OVXC)OVX+檸檬酸鈣 0.5g/kg；H:(LC)0.35ml+檸檬酸鈣 0.5g/kg；I:(HC)1.4ml+檸檬酸鈣 0.5g/kg。

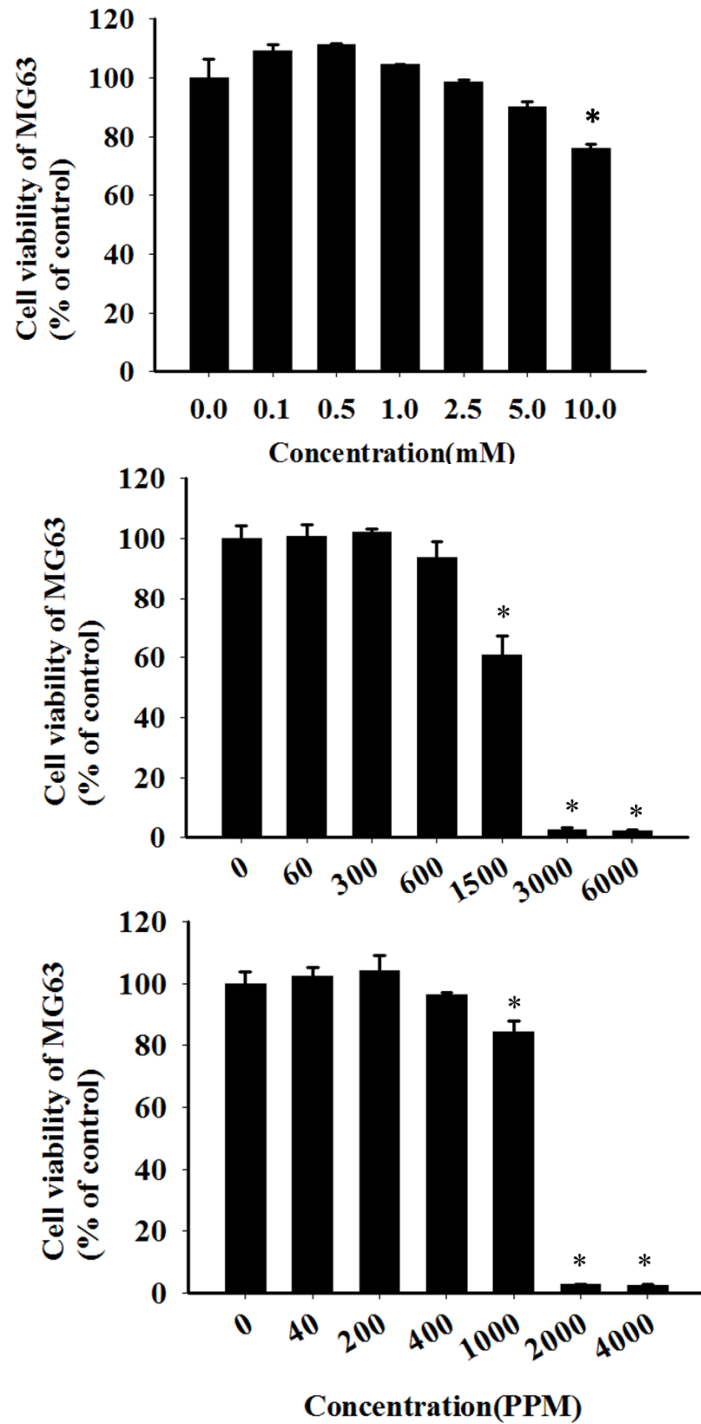


Figure 7. 硫酸鎂及海洋深層水(60K、40K)處理 MG635 之細胞毒性試驗
 以不同濃度的硫酸鎂(MgSO₄ · 7H₂O:0,0.1,0.5,1,2.5,5,10m M)、海洋深層水(60K:0,60,300,600,1500,3000,6000ppm/mL)(40K:0,40,200,400,1000,2000,4000ppm/mL)處理 24 小時之後，對於細胞致死情形。*表示與控制組比較具有統計上之顯著性，P<0.05。

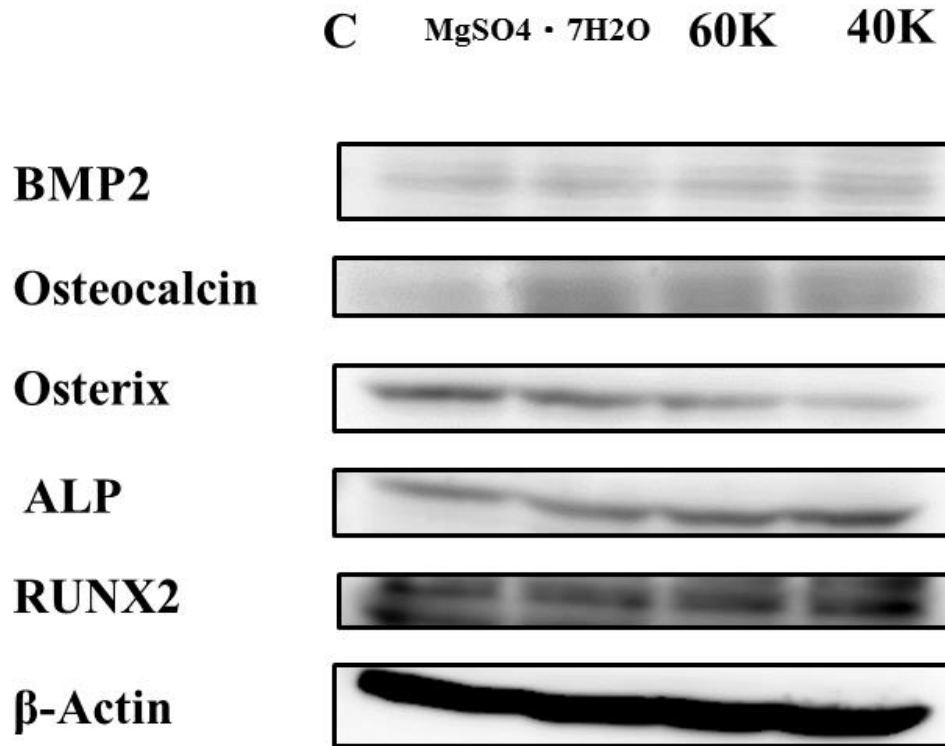


Figure 8. 硫酸鎂及海洋深層水(60K、40K)處理後調節骨質代謝相關蛋白表現量
 MG63 人類骨瘤細胞分別以硫酸鎂 1m M 以及海洋深層水(60K:1500ppm；
 40K:1000ppm)處理 24 小時。運用西方墨點法觀察 RUNX2、ALP、Osterix、
 Osteocalcin、BMP2 等蛋白表現，並以 β -Actin 作為對照。

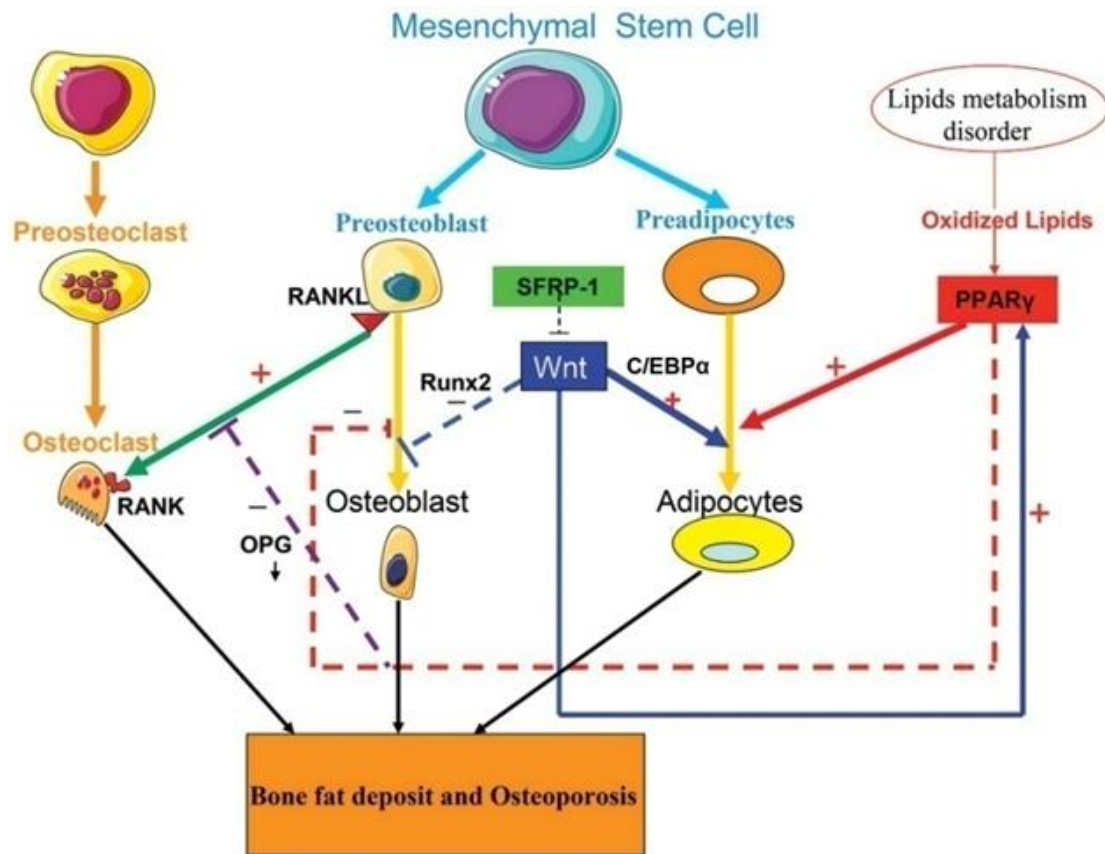
TB	N	NH	OVX	L	M
Bone surface density (1/U)	15.4±1.1	14.6±0.7	11.2±2.6 *	11.6±3.2 *	12.3±3.1 *
Bone surface/volume ratio (1/U)	34.9±5.5	30.4±4.8	32.0±4.4	32.4±5.2	34.5±6.0
Percent bone volume (%)	45.2±8.4	48.9±8.3	36.7±13.3	38.0±16.0	37.5±14.6
Structure model index	-0.03±0.7	-0.35±0.8	0.49±0.9	0.38±1.2	0.56±0.9
Trabacular number (1/U)	4.7±0.5	4.6±0.3	3.4±1.0 *	3.4±1.2 *	3.6±1.1 *
Trabacular separation (U)	0.15±0.03	0.15±0.02	0.31±0.33 *	0.31±0.20	0.3±0.18
Trabacular thickness (U)	0.09±0.12	0.11±0.11*	0.11±0.009 *	0.11±0.01 *	0.10±0.01

TB	H	OVXC	LC	HC
Bone surface density (1/U)	11.5±2.8	10.7±3.7	12.9±2.8	9.56±2.3
Bone surface/volume ratio (1/U)	33.3±6.4	31.5±4.5	30.2±6.5	33.5±4.6
Percent bone volume (%)	36.2±12.7	35.9±16.5	39.0±11.9	29.5±10.8
Structure model index	0.59±0.8	0.49±1.2	-0.39±1.8	0.99±0.7
Trabacular number (1/U)	3.4±1.0	3.2±1.3	4.0±1.1	2.8±0.9
Trabacular separation (U)	0.28±0.12	0.38±0.25	0.24±0.16	0.41±0.19
Trabacular thickness (U)	0.11±0.01	0.11±0.009	0.11±0.02	0.11±0.009

Table 3. 骨小樑分析項目表格

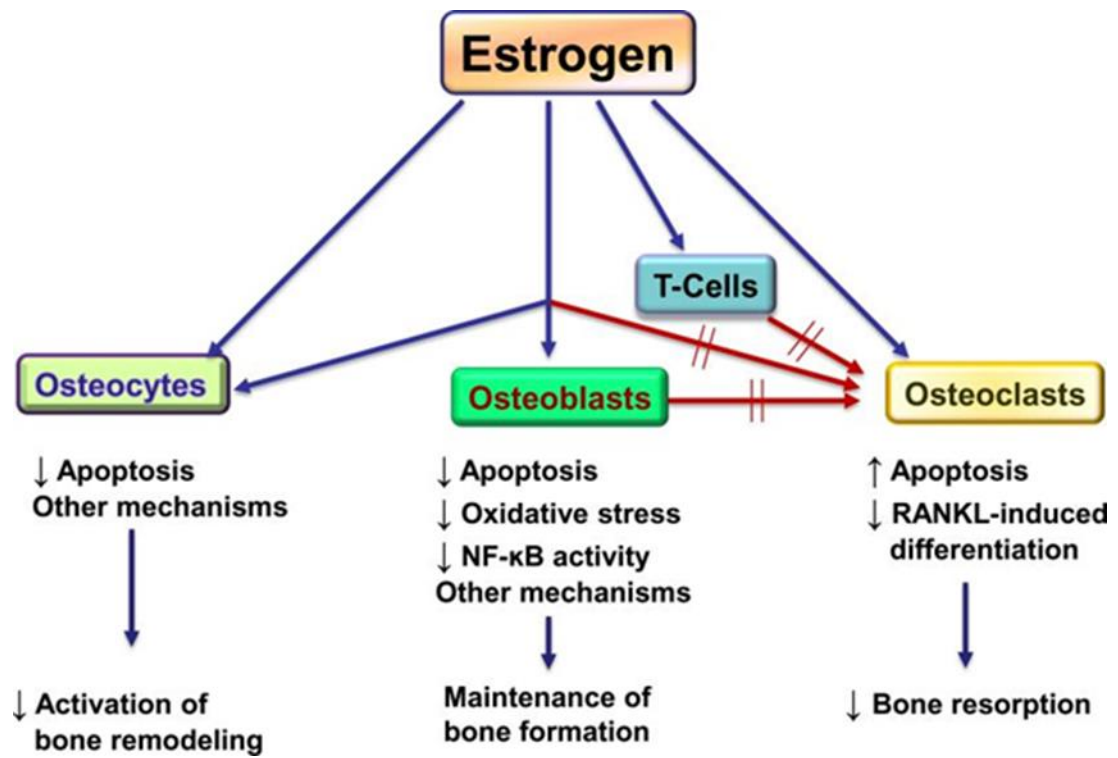
經 micro CT 分析骨小樑 3D 影像，測量表格上方所列舉項目。*:與正常組(Normal)比較具有顯著性，P<0.05；#:與卵巢切除組(OVX)比較具有顯著性，P<0.05；+:與 OVX+ 檸檬酸鈣 0.5g/kg 組(OVXC)相比具有顯著性，P<0.05。

第九章、附錄

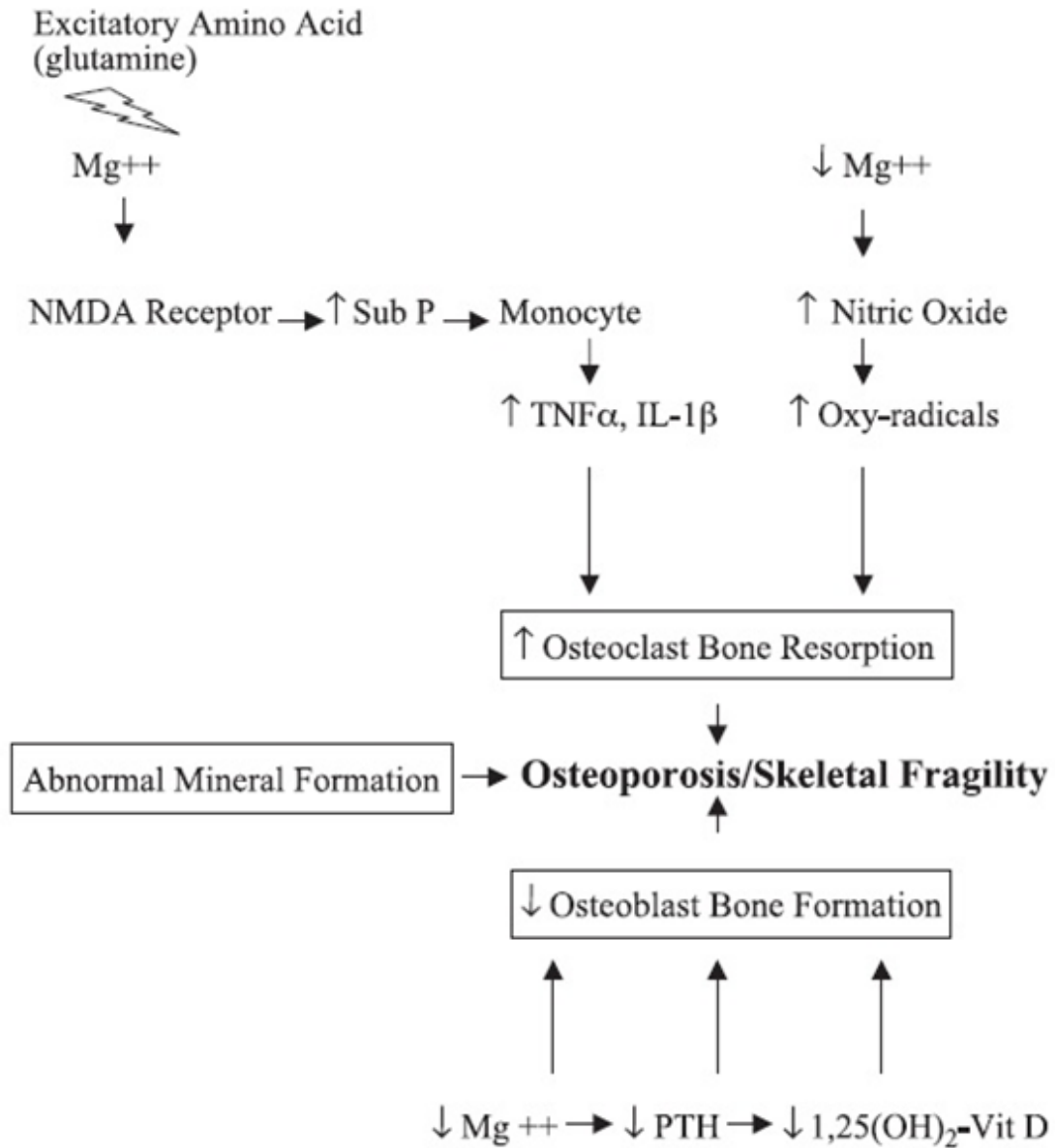


附錄一：成骨細胞(osteoblast)與脂肪細胞(marrow adipocytes)分化調節之路徑圖 (Signaling pathway)

(備註:RANKL, receptor activator for nuclear factor κ B ligand; OPG, osteoprotegerin, C/EBP α , CCAAT-enhancer binding proteins α ; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor γ ; sFRP-1, secreted frizzled-related protein 1; Runx2, runt-related protein 2.)



附錄二：雌激素於骨骼中的調控



附錄三：鎂缺乏所引起骨質流失之潛在機制