

# 目 錄

圖次	i
中文摘要	ii
英文摘要	iv
壹、 文獻回顧	1
一、 骨質疏鬆症	1
1-1. 何謂骨質疏鬆症	1
1-2. 骨頭密度分類	1
1-3. 骨質疏鬆症分類	2
1-4. 造成骨質疏鬆症的危險因子	2
1-5. 台灣骨質疏鬆症的現況	4
二、 牙周病	6
2-1. 何謂牙周病	6
2-2. 牙周病臨床症狀	7
2-3. 牙周致病菌對於人體的影響	7
2-4. 免疫反應對於骨頭的影響	8
2-5. 牙周致病菌造成齒槽骨吸收的可能機轉	9
三、 牙周病和骨質疏鬆症之間的關聯	10
貳、 實驗假說	13

參、	材料與方法	-----	15
一、	實驗材料	-----	15
二、	實驗藥品	-----	16
三、	儀器設備	-----	17
四、	實驗方法	-----	17
1.	細菌培養方法	-----	17
2.	<i>Pg</i> 感染對於卵巢切除老鼠全身性骨頭影響的實驗	-----	17
3.	補充雌激素對感染 <i>Pg</i> 菌的卵巢切除老鼠其骨頭影響的實驗	-----	19
4.	局部感染 <i>Pg</i> 菌對於正常老鼠全身骨頭影響的實驗	-----	20
五、	藥品製備	-----	20
六、	檢測與分析方法	-----	22
1.	細菌數檢測	-----	22
2.	灰化方法	-----	22
3.	鈣的檢測	-----	22
4.	磷的檢測	-----	23
5.	肌酸的檢測	-----	23
6.	鹼性磷酸酵素的檢測	-----	24
7.	Deoxypyridinoline crosslinks (DPD)的檢測	-----	24
七、	統計方法	-----	25

肆、	實驗結果	-----	26
伍、	討論	-----	31
陸、	結論	-----	41
柒、	參考文獻	-----	42

# 圖 次

圖一、	牙周致病菌造成齒槽骨吸收的機轉簡圖	-----53
圖二、	<i>Pg</i> 菌感染對於卵巢切除老鼠全身性骨頭影響實驗的簡圖	-----54
圖三、	補充雌激素對感染 <i>Pg</i> 菌的卵巢切除老鼠其骨頭影響的實驗簡圖	-55
圖四、	局部感染 <i>Pg</i> 菌對於正長老鼠全身骨頭影響的實驗簡圖	-----57
圖五、	<i>Pg</i> 菌的感染對於卵巢切除老鼠尿液中鹼性磷酸酵素的影響	-----58
圖六、	<i>Pg</i> 菌的感染對於卵巢切除老鼠尿液中鈣的影響	-----59
圖七、	<i>Pg</i> 菌的感染對於卵巢切除老鼠尿液中 DPD 的影響	-----60
圖八	<i>Pg</i> 菌的感染對於卵巢切除老鼠全身性鈣的影響	-----61
圖九、	補充雌激素對於感染 <i>Pg</i> 菌的卵巢切除老鼠其尿液中 DPD 的影響	--62
圖十、	補充雌激素對於感染 <i>Pg</i> 菌的卵巢切除老鼠其全身性鈣的影響	----63
圖十一、	<i>Pg</i> 菌的感染對於正常老鼠其尿液中鹼性磷酸酵素的影響	-----64
圖十二、	<i>Pg</i> 菌的感染對於正常老鼠其尿液中鈣的影響	-----65
圖十三、	<i>Pg</i> 菌的感染對於正常老鼠其尿液中磷的影響	-----66
圖十四、	<i>Pg</i> 菌的感染對於正常老鼠其尿液中 DPD 的影響	-----67
圖十五、	<i>Pg</i> 菌的感染對於正常老鼠其全身性鈣的影響	-----68

# 中文摘要

牙周病與骨質疏鬆症都是屬於慢性疾病，容易發生在老年人身上，也都造成骨頭的流失，牙周病是由於細菌感染造成齒槽骨流失，而骨質疏鬆症則主要是由於性荷爾蒙的缺乏而導致全身性骨頭流失。本實驗之目的在探討局部細菌的感染是否會造成缺乏性荷爾蒙個體骨頭流失的增加。將 BABL/c 的老鼠進行卵巢切除，模擬人體停經後的生理情形，並在老鼠背部植入不鏽鋼線圈，然後將 *Porphyromonas gingivalis* (*Pg* A7436) 菌局部感染於老鼠背後的線圈中，收集老鼠的尿液進行鈣、磷、鹼性磷酸酵素、肌酸以及 deoxypyridinoline crosslinks (DPD)，2 個月之後將老鼠犧牲，測量其全身鈣的含量。結果發現，*Pg* 菌的感染對於卵巢切除老鼠的影響為，尿液中的 DPD 在第 10 天 ( $1.81 \pm 0.277$  nmol/mmol)、14 天 ( $2.75 \pm 0.558$  nmol/mmol) 以及 28 天 ( $2.82 \pm 2.029$  nmol/mmol)，皆大於控制組(分別為  $1.28 \pm 0.182$  nmol/mmol,  $1.87 \pm 0.279$  nmol/mmol,  $1.48 \pm 0.633$  nmol/mmol,  $p < 0.05$ )。同時卵巢切除老鼠感染 *Pg* 菌之後，其全身骨頭中鈣的含量也較控制組低 ( $16.6 \pm 0.900$  mg/dL  $\times$   $< 18.2 \pm 0.100$  mg/dL  $\times$ ,  $p < 0.05$ )。然而當補充雌激素後，感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠，其尿液中的 DPD 含量較未補充雌激素且感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠低；而在未感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠中，補充雌激素後，其尿液中的 DPD 含量也較未補充雌激素且未感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠低。而在局部感染 *Pg* 菌於正常老鼠(卵巢未切除)的實驗中，發現尿液中 DPD

的含量在第 2 週 ( $14.94 \pm 0.01$  nmol/mmol)、4 週 ( $20.87 \pm 1.46$  nmol/mmol) 以及 6 週 ( $34.00 \pm 8.76$  nmol/mmol) 都較控制組高 (分別為  $8.00 \pm 0.00$  nmol/mmol,  $9.10 \pm 0.00$  nmol/mmol,  $9.10 \pm 0.00$  nmol/mmol,  $p < 0.05$ )。在全身性鈣的含量實驗, 同樣發現到正常老鼠若感染 *Pg* 菌, 則其全身性鈣的含量也會較未感染 *Pg* 菌的老鼠低 ( $18.1 \pm 1.544$  mg/dL  $\times$   $< 24.2 \pm 0.598$  mg/dL  $\times$ ,  $p < 0.05$ )。本實驗結果發現局部感染 *Pg* 菌的確會造成老鼠全身性骨頭的流失, 可能是因為局部感染細菌的過程中所引起的免疫反應, 促使蝕骨細胞作用使得骨骼中鈣以及 DPD 的流出, 所以造成尿液中兩者含量升高。在此研究中, 我們發現局部感染牙周致病菌 *Pg* 加重了卵巢切除老鼠全身性骨頭的流失, 而將雌激素補充到老鼠體內則會部分保護因局部感染 *Pg* 菌所造成的骨頭流失, 而且局部感染 *Pg* 菌也會造成正常老鼠全身性骨頭的流失。

**關鍵字：**牙周病、骨質疏鬆症、*Porphyromonas gingivalis*、deoxypyridinoline crosslinks、動物模型、骨質。

# 英文摘要

Both periodontitis and osteoporosis are chronic bone diseases, which usual occurs in the elders. Periodontitis is characterized by alveolar bone loss by bacterial infection, whereas osteoporosis predisposes postmenopausal women to systemic bone loss by estrogen deprivation. This study aimed to investigate whether periodontopathogenic bacterial infection would increase the systemic bone loss in ovariectomized mice. *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) strain A7436 were inoculated into the chambers subcutaneously in ovariectomized BALB/c mice, which caused local inflammation in the vicinities of chambers. Animal health status, weight changes, and local inflammation development were recorded, and urines and sera of animals were collected weekly. The mice were sacrificed after two months of experiment and body calcium contents were measured. The urinary levels of deoxypyridinoline crosslinks (DPD) on day 10, 14 and 28 in *Pg*-infected ovariectomized mice were all significantly higher than those in corresponding ovariectomized mice without *Pg* infection ( $1.81 \pm 0.224$  nmol/mmol  $>$   $1.28 \pm 0.081$  nmol/mmol,  $2.75 \pm 0.449$  nmol/mmol  $>$   $1.87 \pm 0.125$  nmol/mmol,  $2.82 \pm 0.907$  nmol/mmol  $>$   $1.48 \pm 0.283$  nmol/mmol, respectively). The total body calcium contents in *Pg* infective ovariectomized mice were significantly lower than those in non-*Pg* infective ovariectomized mice ( $16.628 \pm 1.153$  mg/dL  $\times$   $<$   $18.169 \pm 0.66$  mg/dL  $\times$ ). Both urinary DPD levels and body calcium contents, however, were not significantly different between *Pg* infected and noninfected ovariectomized mice when supplemented with estrogen weekly. We further infected normal mice with *Pg* and again the urine DPD levels in the infected mice were all significantly higher than those in non infective mice in week 2 ( $14.9444 \pm 0.006$  nmol/mmol  $>$   $8.003 \pm 0$  nmol/mmol), 4 ( $20.873 \pm 0.730$

nmol/mmol) and 6 ( $34.000 \pm 4.381$  nmol/mmol) and  $9.102 \pm 0$  nmol/mmol). Body calcium contents of infected normal mice were significantly lower than those in non infective mice ( $18.146 \pm 0.892$  mg/dL  $\times$   $24.155 \pm 0.345$  mg/dL  $\times$ ). In the current study we found that local *Pg* infection indeed caused systemic bone loss in the mice, which supported the hypothesis that local bacterial infection affected the systemic bone through circulation, possibly by inducing immune responses which stimulated osteoclast activities.

**Key words : periodontitis, osteoporosis, *Porphyromonas gingivalis* , deoxypyridinoline crosslinks , animal model, bone.**

## 壹、文獻回顧：

### 一、骨質疏鬆症(osteoporosis)：

#### 1-1. 何謂骨質疏鬆症：

骨質密度會隨著年齡的增加而增加，到了 30 歲左右到達最高峰，之後便會慢慢的流失。骨質疏鬆症是一種早期無症狀的全身性骨頭疾病，病理特徵為骨質減少與顯微結構的改變，而此種改變會導致骨質的脆弱，進而在臨床上增加髌部、脊椎以及腕部骨折的危險性。而 osteopenia 指的是骨量的不足，但尚未達到骨質疏鬆症的程度，然而不管這兩者之間的差別為何，都已經或多或少產生了不可逆的骨質流失。

#### 1-2. 骨頭密度分類：

依照骨頭密度(Bone Mineral Density-BMD)，可將骨頭流失的程度分為以下三類：

(1). 骨質稀少症(Osteopenia)：當骨頭密度低於一般年輕女性平均值的

1-2.5 個標準偏差時稱之。

(2). 骨質疏鬆症(Osteoporosis)：當骨頭密度低於一般年輕女性平均值超過

2.5 個標準偏差時稱之。

(3). 嚴重性骨質疏鬆症(Established osteoporosis)：當骨頭密度低於一般年

輕女性平均值超過 2.5 個標準偏差時，而且又有多處骨折時稱之。(1,

2, 3)

### 1-3. 骨質疏鬆症分類：

骨質疏鬆症可以分為兩種類型：第一類型為原發性骨質疏鬆症(Primary osteoporosis)，第二類型為續發性骨質疏鬆症(Secondary osteoporosis)，一般以原發性骨質疏鬆症為主。

(1).原發性骨質疏鬆症(Primary osteoporosis): 又可分為類型 1 及類型 2。

A. 類型 1：主要與停經有關，發生在婦女停經後 15-20 年，骨質流失容

易發生在海綿骨(trabecular bone)上，像是脊椎骨、遠端橈骨及足

踝，此類型的骨質疏鬆症是屬於加速性的骨頭流失。

B. 類型 2：主要與老化有關，發生在 70 歲以後的男性及女性，容易發

生在海綿骨與致密骨(cortical bone)上，其骨頭流失是屬於緩慢型。

(2).續發性骨質疏鬆症(Secondary osteoporosis): 造成續發性骨質疏鬆症的

因素有以下幾種：

A. 癌症：如多發性的骨髓癌。

B. 藥物：如類固醇或是抗癲癇的藥物。

C. 內分泌疾病：包括生殖腺功能不足、甲狀腺疾病或是副甲狀腺機能失調。

D. 發炎：如關節炎。

### 1-4. 造成骨質疏鬆症的危險因子：

造成骨質疏鬆症的危險因子包含有兩種因素，一種為內在因素，

另一種為外在因素，內在因素有種族、性別、家族遺傳和年齡。而外在因素有生活型態(抽煙、喝酒)、飲食(缺乏鈣質、維他命 D 或是高蛋白質的攝取)以及藥物服用(類固醇)。

(1). 內在因素：

- A. 種族：1994 年 Anderson 文章中指出，成年的黑人及小孩在相同的飲食之下，相較於白種人其尿液中鈣的排泄量較低，且骨骼中鈣的保存量也較高(4)，再加上黑種人的骨頭密度較白種人高，所以白種人罹患骨質疏鬆症相較於黑種人高。
- B. 性別：先天男性和女性的骨質就有差別，男性骨頭密度較女性高，再加上女性的骨頭流失會受到荷爾蒙的影響，所以女性比男性較容易患得骨質疏鬆症(4)。
- C. 家族遺傳：基因會影響成長過程中骨頭的發育，也會影響因年紀所造成的骨頭流失，所以若家中有人患有骨質疏鬆症，則家人患有骨質疏鬆症的機率會比一般人高(5)。
- D. 年齡：女性骨頭發展的巔峰時期平均為 25 歲左右，而男性骨頭發展的巔峰期則為 30 到 35 歲之間，之後骨頭就會隨著年紀的增長而逐漸流失，所以老年人較年輕人易患有骨質疏鬆症(6)。

(2). 外在因素

- A. 生活型態：有抽煙(7)或是喝酒習慣者(8)其骨頭流失的情形會較高。

B. 藥物：服用類固醇藥物的病患容易造成骨頭流失也會增加骨折的危險性(9, 10)。

C. 飲食：若飲食中缺乏鈣 (11)、維他命 D (12)或是高蛋白質 (13)的攝取，容易造成骨頭流失。

#### 1-5. 台灣骨質疏鬆症的現況：

1997 年 Tsai 研究指出，台灣人的骨頭密度和白種人相似，髖部的骨頭密度則較白種人低 10-15% (14)。在台大醫院所做的一篇報告中指出，202 位健康男性以及 507 位健康女性中，年紀在 21-70 歲之間，發現在相同年齡下，男性的股骨頸(femoral neck)和股骨的隆起(trochanter)其骨頭密度都較女性高(15)。所以骨頭密度和性別以及種族是有很大的差異，但除了性別以及種族之外，骨頭密度也會隨著年紀的增加而減少，其減少的比例大約每年為 0.2-1%。

1941 年 Albright et al 指出女性停經後的骨質疏鬆症和停經後雌激素分泌的減少有很大的關係(16)。同樣的台灣醫學中心利用 dual x-ray absorptiometry (DEXA)以及 dual-photon absorptiometry 測量骨頭的密度，也同樣發現到年齡以及停經都和女性的骨頭密度有很大的關係(17, 18, 19, 20)，另外其它相關的研究中也發現，當過了骨量巔峰期之後(25-30 歲)，男性和女性其骨頭流失的速率每年約為 0.5%到 1%之間(21)，但女性在停經後的 5 到 10 年之間，其骨頭流失的速率會增加到 15% (21)。1996 年

Tsai 的研究中也發現到，50 歲之後的女性其脊椎的骨頭密度會明顯的下降，而且超過 65 歲之後，脊椎骨折的盛行率也會比同年齡男性高(女性 19.8% > 男性 12.5%) (22)。由於女性停經後雌激素分泌減少會增加骨頭流失的速率，而當骨頭流失過於嚴重時，則其罹患骨質疏鬆症的機率就會提高很多，因此在研究中發現，骨質疏鬆症女性比沒有骨質疏鬆症的女性其顎骨密度(mandibular bone mass)較低而且在 gonion 的部位有較薄的皮質骨(23, 24)。Von Wowerm 的研究中也同樣發現到，骨質疏鬆症引起骨折的婦女，其顎骨的礦物含量比起正常的婦女低(25)。而在 1994 年 Shen 報告中，停經後婦女的腰部脊椎骨(lumbar spine)、Ward' s triangle 以及全身性的骨頭，其流失速率平均每年分別為 0.00675、0.01165 和 0.00975 g/cm<sup>2</sup> (26)。

骨質疏鬆症造成的併發症有脊椎骨骨折、前臂遠端骨折、股骨近端骨折以及髌部骨折，當髌部以及脊椎骨折時，病人的日常生活品質會受到相當大的影響，而且嚴重的骨折甚至會導致死亡，從診斷出有髌部骨折到死亡，其間的存活率隨著時間的增加而逐年減少，一年當中因為髌部骨折而導致死亡的比例有 30% (27)。另外在 1994 年人口調查中發現，台灣女性超過 50 歲的人口，佔全台灣女性人口的 18.3 % 且佔全台灣人口的 8.9 % (22)，而老年人口(大於等於 65 歲)佔全台灣人口的 7.23 % (28)，由於台灣人口比例逐漸走向高年齡層的階段，所以預計台灣到 2021 年人口組成的

比例老年人會佔 13.9% (29)，趨時老年人受到骨折的威脅將會提高許多，相對的因骨折傷害所需的相關醫療或是理賠費用也會增加，在一項調查中發現，1996 年台灣老年人(大於 65 歲)因髖部骨折而獲得保險理賠的人，比例為每十萬人當中有 203 人，這樣的比例比起歐洲和北美的白人低，但和中國北京相近(28, 30)。而另一項調查發現 1993 年台灣老年人花在髖部骨折上的相關醫療費用以及社會成本總共美金 12 億元(27)，因此骨質疏鬆症所造成的生命危害以及社會成本都相當大，所以骨質疏鬆症是一個相當值得大家重視的一個問題。

## 二、 牙周病：

### 2-1. 何謂牙周病：

牙周病的定義為牙周附連喪失以及骨頭吸收。牙周病是一種慢性發炎疾病，造成牙周病的危險因子有牙周致病菌、抽煙、年齡、糖尿病、骨質疏鬆症、愛滋病感染以及放射線的照射、抑制免疫能力藥物的服用等。但以牙齦下致病菌的沉積以及口腔衛生不良的影響力最大(31)。

牙周病是由格蘭氏陰性菌感染所造成，主要有 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa)、*Porphyromonas gingivalis* (Pg)、*Prevotella intermedia* (Pi)和 *Bacteroides forsythus* (Bf)，而且這些細菌都會造成齒槽骨的吸收(32)，但隨著種族以及地理環境的變異，牙周致病菌的種類分佈也會受到影響。

## 2-2. 牙周病臨床症狀：

在臨床上最常見的主要是成年型牙周病。如果病人不重視口腔衛生，便可以發現細菌在口腔中滋生進而產生牙垢和牙結石，然後產生牙周病。當患有牙周病時，牙齒周圍的支持組織便會受影響而發炎，因此在臨床上可以看到牙齦出血、齒槽骨的吸收、牙齦附著能力減弱、牙齒晃動等臨床特徵，最後甚至會導致牙齒的掉落。在美國有超過 50% 的成年人，其口腔中平均有 3-4 顆牙齒患有牙齦炎(gingivitis)，而有 67% 的人口有牙齦下(subgingival)結石。如果以牙齒囊袋深度 4mm 做為標準，則發現有 30% 的人口平均 3-4 顆牙齒患有成年型牙周病(33)。

## 2-3. 牙周致病菌對於人體的影響：

牙周病中的兩個主要致病菌 *Aa*、*Pg* 都具有形成菌落、躲避宿主防禦機制以及產生破壞組織的物質(34)。而且還能夠侵入到人體口腔的組織中，像 *Aa* 便可以穿透上皮細胞進入結締組織，而 *Pg* 除了可以侵入上皮細胞之外還可以存留在上皮細胞，也就是因為這些致病菌具有這樣的侵襲特性，所以臨床上就很難用牙科器械將這些致病菌清除乾淨，再加上這些致病菌還可以產生水解蛋白酶，直接降解血清和牙齦液中的抗體以及補體蛋白，所以造成牙周組織更大的傷害。

在體外實驗中，內毒素(endotoxin)被發現會誘導骨頭吸收的細菌分子，而 *Pg* 中的脂質多醣體(lipopolysaccharide, LPS)以及 *Aa* 的表面蛋白

(surface proteins)和外膜蛋白(outer membrane proteins), 在體外實驗中也都  
會促進骨頭的吸收(35)。然而就這些牙周致病菌而言, *Pg* 菌與成年型牙  
周病有很大的關聯(36)。 *Pg* 菌中的一些主要成份像脂質多醣體以及纖毛  
(fimbriae)都和骨頭吸收有關, 在體外實驗中可以發現 *Pg* 菌的脂質多醣體  
可以誘導骨頭的吸收, 而且也會抑制骨頭前驅細胞(osteoprogenitor cell)分  
化進入成骨細胞(37), 而 *Pg* 菌的纖毛會誘導骨頭細胞表現 interleukin-1  
(IL-1)的 mRNA 以及顆粒球-巨噬細胞刺激因子(granulocyte-macrophage  
colony-stimulating factor, GM-CSF) (38)。除此之外 *Pg* 菌的一些產物也會  
影響骨頭的吸收, 像是蛋白酵素(protease)、膠原酵素(collagenase)、纖維  
蛋白酵素(fibrinolysin)、磷脂酵素(phospholipase A) (34)。這些酵素都可以  
直接降解牙周表面組織, 還有 *Pg* 菌的代謝產物像  $H_2S$ 、 $NH_3$ 、脂肪酸,  
也都會造成週圍細胞的毒性(39, 40, 41, 42)。在動物實驗中, 像是猴子  
(43)、無菌鼠(gnotobiotic)(44)、特殊無病原體老鼠(specific pathogen-free  
mice)中(45), 都可以發現 *Pg* 菌造成齒槽骨的流失。

#### 2-4. 免疫反應對於骨頭的影響：

在牙周病患的牙齦中發現有許多的免疫和發炎細胞包括嗜中性白血  
球(neutrophils)、單核細胞(monocytes)、白血球(leukocytes)、淋巴球  
(lymphocytes)、巨嗜細胞(macrophages)以及漿細胞(plasma cells)。這些細  
胞都是宿主為了保護自己所產生的防禦細胞, 像嗜中性白血球以及巨嗜細

胞會吞噬和殺死細菌。雖然宿主會產生這些防禦細胞，但是細菌還是可以藉由減少宿主的防禦細胞以及破壞宿主的調理作用和噬菌作用等機制，進而躲避防禦細胞的控制。像 *Pg*、*Aa*、*Fn* (*Fusobacterium nucleatum*)等牙周致病菌就可以減弱防禦細胞的活性像趨化性(chemotaxis)和吞噬作用(phagocytosis) (32)，而所產生的白血球毒素(leukotoxin)甚至可以殺死嗜中性白血球(46)。

牙齦下細菌感染使得宿主產生免疫反應，進而刺激免疫細胞分泌調節骨頭的細胞激素然後作用在骨頭細胞上。這些細胞激素以及調節骨頭吸收的物質有 IL-1、interleukin-6 (IL-6)、interleukin-8 (IL-8)、tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、prostaglandin  $E_2$  (PGE $_2$ )、interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )等。

## 2-5. 牙周致病菌造成齒槽骨吸收的可能機轉：

牙周病造成齒槽骨吸收的機轉，一為牙周致病菌產生脂質多醣體直接造成齒槽骨的吸收，另一途徑為脂質多醣體引起牙周組織的發炎，吸引更多的單核細胞以及巨噬細胞，而脂質多醣體會促進這些發炎細胞產生 IL-1、腫瘤壞死危險因子、IL-6 以及前列腺素  $E_2$  等細胞激素以及危險因子，其中 IL-1 和腫瘤危險因子會直接抑制成骨細胞前趨物分化成成骨細胞，而且會活化蝕骨細胞的活性而加速骨頭的流失，除此之外 IL-1 和腫瘤危險因子也會刺激單核細胞和纖維母細胞釋放前列腺素  $E_2$ ，前列腺素  $E_2$  釋放後會刺激金屬蛋白酵素的釋放，而降解細胞外的基質蛋白。另外 T

細胞也會分泌 IL-6，IL-6 同樣也會抑制成骨細胞的分化以及活化蝕骨細胞的活性，進而造成骨頭的流失。而 IFN- $\gamma$  和 IL-8 也會吸引更多的單核細胞以及巨噬細胞到發炎組織的地方，使得發炎組織產生更多的細胞激素以及危險因子，最後造成齒槽骨更大的流失。

### 三、 牙周病和骨質疏鬆症之間的關聯：

牙周病和骨質疏鬆症都是屬於慢性疾病，而且也都會隨著年齡的增加而發生率越顯增加(47)，由於這兩種疾病都會造成骨頭的流失，牙周病是因為局部感染牙周致病菌而導致齒槽骨的流失，而骨質疏鬆症主要是因為缺乏性荷爾蒙的調節，而導致全身性骨頭流失，所以近幾年內有許多學者都投入在這兩種疾病中的研究，以深入研究探討牙周病與骨質疏鬆症之間的關聯性。

Hidaka 的實驗中，將老鼠進行卵巢切除手術以及假手術（同樣進行手術但卵巢未切除），在這兩組老鼠中發現卵巢切除的老鼠其下顎骨的關節頭較假手術組小，而且牙周韌帶也變粗，甚至在卵巢切除的老鼠中發現到其齒槽骨表面有許多的小結節(small granules)，但在假手術組中卻沒有發現到(48)。另一項動物實驗中，將老鼠分成卵巢切除組以及控制組（未進行手術），然後同時在這兩組老鼠的第一大白齒遠心根的根管中置入 *Campylobacter rectus* 的脂質多醣體，發現到不管是卵巢切除或是未切除的老鼠其牙根間的骨頭都受到破壞，但是卵巢切除的老鼠其破壞的情形比

控制組更加嚴重(49)。

除了動物實驗之外，在臨床人體實驗上 Tezal 針對 70 位停經後婦女(年齡在 51 到 78 歲之間的白人婦女)進行研究，發現到齒槽骨的流失與股骨隆起(trochanter)、Ward's triangle 以及整根股骨都有顯著的關聯，而牙齦附著的流失也同樣的與全身性的骨頭密度有關(50)。1999 年 Payne 研究 38 位已經停經 5 年的婦女，這些婦女患有牙周病沒有抽煙的習慣，在這 38 位婦女當中有 17 位的腰椎骨患有骨質疏鬆症，其餘的 21 位則是正常者，在這項研究中發現，腰椎骨患有骨質疏鬆的婦女比正常者有較高頻率的齒槽骨與齒槽脊的流失以及齒槽脊下骨頭密度的流失 (51)。而另一項研究中，12 位因骨質疏鬆症而患有骨折的婦女以及 14 位正常婦女，在這研究中發現到骨質疏鬆症的婦女其下顎骨以及前臂骨的骨頭含量都較正常組低，而且牙齦附著也比正常組低(52)。

將動物進行卵巢切除可以模擬人體停經後的生理狀況，利用這樣的動物模型從事骨質疏鬆症的研究，可以發現到骨質疏鬆症會影響牙周組織的健康以及齒槽骨吸收的情形。另外臨床人體實驗中同樣的也發現到，當患有骨質疏鬆症時患者會有齒槽骨流失、牙齒掉落、齒槽冠高度的流失以及齒槽脊的吸收等現象產生(50, 51, 52)。綜合以上的實驗結果可以得知不管是動物實驗或是人體實驗，骨質疏鬆症的確會影響牙周組織以及齒槽骨的健康狀況，但是在這些相關研究中多數都是探討骨質疏鬆症對於牙周組織

以及齒槽骨的影響，卻鮮少有研究去探討牙周病對於骨質疏鬆症的影響，然而由於牙周病是一種慢性局部發炎的疾病，它主要是由牙周致病菌所造成，臨床上會發現到牙齦出血、牙周囊袋變深、牙齦附著變差以及齒槽骨的吸收，甚至到最後會導致牙齒的掉落，同時也可以發現到，牙齦液中或是牙齦組織中都有較高的發炎物質如 IL-1 (53, 54)、腫瘤壞死因子(55)和前列腺素 E<sub>2</sub> 等。但這些造成牙周病的相關危險因子如牙周致病菌以及發炎物質是否也會藉由其它不同的路徑，而使得原本的局部性骨頭的破壞而直接或間接的影響到全身性骨頭的流失，因此我們做了本篇的研究藉由檢測骨頭流失的生化指標，包括鈣、磷、鹼性磷酸酵素、肌酸以及 DPD 的含量，進一步探討牙周致病菌對於全身性骨頭的影響。

## 貳、 實驗假說：

目前的研究多是骨質疏鬆症對於口腔健康的影響，鮮少有研究是從事牙周致病菌感染對於骨質疏鬆症的影響，因此本研究想從另一個角度來探討骨質疏鬆症與牙周病之間的關聯性，所以做了此假設：牙周致病菌 *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) 的感染會造成全身性骨頭的流失。

針對「牙周致病菌 *Porphyromonas gingivalis* 的感染會造成全身性骨頭的流失」的假說，我們做了以下的實驗設計：

牙周致病菌的感染會造成局部齒槽骨的吸收，但局部牙周致病菌的感染是否會影響到全身性骨頭的流失，則需要深入的研究探討，而本實驗將老鼠的卵巢切除模擬女性停經後的生理狀況，再利用此動物模型研究牙周致病菌 *Pg* 的感染對於老鼠全身性骨頭流失的影響。

卵巢切除的老鼠感染 *Pg* 菌之後，除了本身因卵巢切除所造成的全身性骨頭流失之外，若還會因 *Pg* 菌的感染而加重骨頭流失時，我們將進行第二個實驗，將卵巢切除的老鼠補充雌激素，探討其因 *Pg* 菌感染所造成的全身性骨頭吸收是否會受到保護的作用。

如果 *Pg* 菌感染會加重卵巢切除老鼠全身性骨頭的流失，而且補充雌激素也會保護老鼠全身性骨頭的流失時，我們將進一步探討局部 *Pg* 菌感染對於正常老鼠(未進行卵巢切除手術)全身性骨頭的影響為何。

本實驗的具體目標：

- (1). 研究皮下局部 *Pg* 菌感染是否會加重卵巢切除老鼠(模擬人體停經後引起的骨質疏鬆症)全身性骨頭的流失？
- (2). 探討雌激素的補充是否會保護卵巢切除老鼠因受到 *Pg* 菌的感染所導致的全身性骨頭流失？
- (3). 正常的老鼠(未進行卵巢切除)局部感染 *Pg* 菌時，是否也會造成全身性骨頭的流失？

## 參、材料與方法：

### 一、實驗材料：

#### 1. 實驗動物：

向國科會購買八週大 BALB/c 母鼠，以 6 隻為一籠飼養於中山醫學大學動物中心，光照時間為 12 小時，定時給予飼料以及飲水，使其自由進食。

#### 2. 實驗細菌：

*Pg* A7436，從牙周病患者身上分離出來的一種細菌株，具有毒性以及高侵襲性，本株細菌是由美國北卡羅萊納大學教堂山分校口腔醫學中心所贈與。

#### 3. 實驗線圈：

外科手術用不鏽鋼線圈，平均一個重量為 7.90 g，長度平均為 10 mm，線圈直徑為 5 mm，若長期置於皮下，並不會引起發炎及排斥反應。

#### 4. 雌激素：

實驗中所使用的雌激素其濃度為 1 mg/ml，由雌二醇(17 $\beta$ -estradiol)購自美國 Sigma 公司) 與芝? 油 (購自美國 Sigma 公司)以 1 : 1 的比例混合所得。

## 二、 實驗藥品：

### 1. 培養細菌用藥：

- (1). Bacto-agar：購自美國 Difco 公司
- (2). Brucella agar：購自美國 Difco 公司
- (3). NaOH：購自 Fluka 公司
- (4). Hemin-dissolve：購自美國 Sigma 公司

### 2. 檢驗用藥：

- (1). Brain heart infusion broth (dehydrated)：購自 GIBCO BRI (U.K.)
- (2). Yeast extract：購自 USBiological 公司
- (3). Resazurin：購自美國 Sigma 公司
- (4). Cysteine HCl-H<sub>2</sub>O：購自德國 Merck 公司
- (5). Hemin-dissolve：購自美國 Sigma 公司
- (6). Menadione (Vitamin K)：購自美國 Sigma 公司
- (7). HNO<sub>3</sub> (100 %)：購自德國 Merck 公司

### 3. 分析用藥：

- (1). Creatinine：購自德國 HUMAN 公司
- (2). Alkaline Phosphatase：購自德國 HUMAN 公司
- (3). Calcium：購自德國 HUMAN 公司
- (4). Phosphorous：購自德國 HUMAN 公司

(5). DPD ELA kit (Deoxypyridinoline Crosslinks): 購自美國 QUIDEL 公司

### 三、儀器設備：

(1). 厭氧箱：ELECTROTEK：AW200SG

(2). 無菌操作台：TELSTAR：BIO- -A

(3). 紫外光可見光光譜儀：BECKMAN COULTER DU640B

(4). 水浴槽：DS LAB THERMOSTATIC BATH:DSB-500

(5). 高溫爐：JELENKO：LFCS

(6). Microplate Reader：METERTECH S960

### 四、實驗方法：

#### 1. 細菌培養方法：

將 *Pg* A7436 菌培養在 Brucella Blood Agar (BBAP)培養基中，再將含有 *Pg* A7436 菌的 BBAP 培養基，置於厭氧箱中進行培養(CO<sub>2</sub> 10%、H<sub>2</sub> 10%、N<sub>2</sub> 80%)，三天之後，將培養基從厭氧箱中取出，在無菌操作台中把 *Pg* 菌全部從培養基中刮下，再將刮下的 *Pg* 菌置入 Brain Heart Infusion Broth—Supplemented (BHI)培養液中，然後將培養液中的 *Pg* 菌震盪，使其溶於培養液中，再將菌液稀釋 10 倍以及 1000 倍，最後利用可見光光譜儀(波長為 600 nm)檢測細菌數。

#### 2. *Pg* 菌感染對於卵巢切除老鼠全身性骨頭影響的實驗：

老鼠飼養一個星期之後(九週大)，在手術室無菌操作之下進行皮下

種植線圈手術，將老鼠麻醉，剃除老鼠背後頸部的毛髮，噴上 70% 的酒精，利用滅菌過的手術剪及夾子，在頸部上開一個小洞，然後利用夾子將線圈植入於背部的左右後方各一個，線圈種植完後將傷口利用 4-0 羊腸線縫合，最後再擦上碘酒。

手術完後 2 個星期(十一週大)，進行卵巢切除手術，將老鼠麻醉然後剃除腹部的毛髮，並將老鼠置於木板上腹部朝上，然後利用細繩將老鼠的四肢固定於木板上，手術前在腹部噴上 70% 的酒精，利用滅菌過後的手術剪及夾子將老鼠的腹部剪開，找出左右兩側的卵巢並將卵巢完全切除，手術完後先縫合肌肉層最後再將腹部外皮縫合，縫合完後再擦上碘酒，將手術完後的老鼠置於乾淨的老鼠籠中並利用桌燈讓老鼠保持體溫，使得老鼠可以避免因失溫而死亡，進而增加手術的成功率。

老鼠卵巢切除完後一個月(15 週大)，將老鼠分成三組，其中一組利用 26 號半針頭將活的 *Pg* ( $10^8$  CFU/ml) <註一> 接種於線圈中，這組老鼠簡稱為 Live，另一組接種死的 *Pg* ( $10^9$  CFU/ml) <註二> 於線圈中，簡稱為 Dead，而第三組則接種 100  $\mu$ l 的 BHI 培養基液於線圈中，簡稱為 Control。本實驗每週接種一次細菌，並且每週收集一次尿液(3 天的總尿量) <註三> 為期二個月。

<註一>. 先前實驗中發現若接種  $10^9$  CFU/ml 的細菌數會導致老鼠的死亡，所以改接種  $10^8$  CFU/ml 的細菌數。

<註二>. 死菌處理方式：

將培養基上的 *Pg* 菌全數刮下，置於 500  $\mu$ l 的 BHI 培養液中，振盪混合均勻之後，置於加熱器上水沸後煮 15 分鐘，然後將煮沸過後的菌液塗抹於培養基中進行培養，確認無細菌存活。

<註三>. 收尿方式：

收集尿液的過程中，將老鼠置於代謝籠中，一個代謝籠一隻老鼠，定時更換飲水以及飼料，代謝籠的下方各有一個集尿瓶以及糞便瓶，每週定期收集尿液完後，會將使用完後的代謝籠清洗乾淨並擦乾，以備下週繼續收集尿液使用，收集到的尿液，於實驗室中進行定量並分裝，最後將尿液儲存在 -80°C 的冰箱中，以便日後進行尿液分析。

### 3. 補充雌激素對於感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠其骨頭流失影響的實驗：

首先在老鼠背後左右兩側各種植一個線圈，兩個星期之後，進行卵巢切除，將老鼠腹部打開然後將左右兩側的卵巢切除，最後再將腹部縫合，完成手術後的老鼠成為 Ovariectomized (簡稱 OVX)。手術完後的一個月，卵巢切除組(OVX)以及控制組(CON)，分別接種活 *Pg* 菌，依序簡稱為 XL 以及 CL，另外三組的老鼠則分別接種 BHI 培養基液，分別簡稱為 XN 以及 CN，而在 XL 以及 XN 這兩組老鼠中，又分別於腹部接種 0.02 mg 的雌激素，XL 以及 XN 接種雌激素之後分別簡稱為 XEL 以及 XEN，實驗為期兩個月，每週接種雌激素或是 BHI 培養液二次，而且

每周收集一次尿液(三天尿液總量)。

#### 4. 局部感染 *Pg* 菌對於正常老鼠全身骨頭影響的實驗：

老鼠飼養一個星期之後(九週大)，在手術室無菌操作之下進行皮下種植線圈手術，將老鼠迷昏剃除老鼠背後頸部的毛髮，噴上 70% 的酒精，利用滅菌過的手術剪及夾子，在頸部開一個小洞，然後利用夾子將線圈植入於背部的左右後方各一個，線圈種植完後將傷口縫合，最後再擦上碘酒，手術完後兩個星期(十一週大)，將老鼠分成三組，第一組老鼠利用 26 號半針頭將活的 *Pg* 菌( $10^8$  CFU/ml)接種於右邊線圈中，簡稱 LBA，第二組則接種死的 *Pg* 菌( $10^9$  CFU/ml)，簡稱 DBA，第三組只接種 100  $\mu$ l 的 BHI 培養液，簡稱 CON，本實驗維持兩個月，每週接種一次細菌並每週定期收集一次尿液(3 天的總尿液量)。

### 五、藥品製備：

#### 1. Brucella Blood Agar (BBAP) 培養基：

---

---

dH <sub>2</sub> O	1000 ml
Brucella agar	43 g
Bacto-agar	3 g
Defibrinated sheep blood	50 ml
Hemin-menadione solution	10 ml

---

---

先加少許的一次水然後秤量 43g 的 Brucella agar 以及 3 g 的 Bacto-agar，再加水置 1000 ml，然後加熱使其完全溶解，最後高溫滅菌 121°C，15 分鐘，滅菌完後將培養基液從高溫滅菌壺取出，置於水浴槽

中使其降溫置 45~50 °C，等溫度降至 45~50 °C 之後，將培養基液置於無菌操作台中，一邊搖一邊加入 10 ml 的 Hemin-menadione solution <註四> 以及 50 ml 的 Defibrinated sheep blood，然後快速的分裝到培養基盤子上，等培養基冷卻之後再置入 4 °C 冰箱中儲藏。

<註四>. Hemin-menadione solution 的製備：

將 50 mg 的 hemin-dissolve 加入 1 ml 1N NaOH 中，最後加入一次去離子水至 100 ml，最後高溫滅菌 121 °C，15 分鐘，然後將 100 mg 的 menadione 加入 20 ml 的一次水中，利用過濾法滅菌，最後取 1 ml 的 menadione 加入 100 ml 的 hemin solution 即為 hemin-menadione solution

## 2. Brain Heart Infusion Broth-Supplemented (BHI)培養液

Brain Heart Infusion Broth (dehydrated)	3.7 g
Yeast extract	0.5 g
dH <sub>2</sub> O	100.0 ml
Resazurin solution	0.4 ml
Cysteine HCl·H <sub>2</sub> O	0.05 g
Hemin solution	1.0 ml
Vitamin K	0.02 ml

先加少許的一次水，然後加入 3.7 g 的 Brain Heart Infusion Broth (dehydrated) 0.5 g 的 Yeast extract 以及 0.4 ml 的 Resazurin solution <註五>，然後將配好的溶液煮沸使其溶解，等溶液冷卻之後再加入 0.05 g 的 Cysteine HCl·H<sub>2</sub>O、1.0 ml 的 Hemin solution 以及 0.02 ml 的 Vitamin K，最後高溫滅菌 121 °C，15 分鐘。

<註五>. Resazurin solution 的製備：取 25 mg 的 Resazurin 溶於 100 ml 的一次水中。

## 六、檢測與分析方法：

### 1. 細菌數檢測：

將原細菌液取出 100  $\mu$ l 加入 900  $\mu$ l 的 BHI 培養液，再從稀釋 10 倍的菌液，取出 10  $\mu$ l 加入 BHI 培養液，分別將稀釋 10 倍以及 1000 倍的菌液，取 500  $\mu$ l 置於拋棄式石英管中進行定量檢測，並利用 500  $\mu$ l BHI 培養液為標準液。

### 2. 灰化方法 (單位 mg/dL\*g)：

將老鼠用鋁箔包好，放入高溫爐子中，溫度控制在 600 $^{\circ}$ C，灰化 6 小時，等骨灰冷卻後倒入在大的培養基盤中，用 6N 100 ml 的硝酸(HNO<sub>3</sub>) <註六>溶解至少 24 小時以上，最後將溶解後的骨灰液，取 10 ml 進行鈣的測試。

<註六>. 6N 的硝酸配製方法：取 250 ml 的 100 % 硝酸(MERCK)加一次水至 1000 ml。

### 3. 鈣的檢測 (Calcium：單位 mg/dL)：

配製作用溶液(working solution)，將 Color reagent 和緩衝溶液(Buffer Solution)等體積混合，在室溫下 10 分鐘後以備使用，然後將樣本(尿液/血液)稀釋 30 倍 (1  $\mu$ l 的樣本加入 29  $\mu$ l 的二次水)，最後取標準液 <註

七>以及檢體各 20  $\mu$ l，利用可見光光譜儀(波長 570 nm)檢測鈣離子。

<註七>製備標準液：

編號	濃度	劑量
1	8 mg/dl	20 $\mu$ l 標準液
2	4 mg/dl	10 $\mu$ l 標準液 + 10 $\mu$ l 的二次水
3	2 mg/dl	5 $\mu$ l 標準液 + 15 $\mu$ l 的二次水
4	1 mg/dl	2.5 $\mu$ l 標準液 + 17.5 $\mu$ l 的二次水

#### 4. 磷的檢測 (Phosphorus：單位 mg/dL)：

利用鉬酸藍法(Molybdenum blue)方法檢測(依據 Flscher Sabro 法為例)，鉬酸氨(ammonium molybdate，六價鉬)與磷酸鹽(phosphate)作用形成磷鉬酸鹽(phosphomolybdate)，最後還原成藍色的鉬酸藍(heteropolymolybdenum blue，五價鉬)，以 340 nm 波長比色(何敏夫 編著，臨床化學第三版，合計圖書出版社，p389-392，西元 2000 年)。

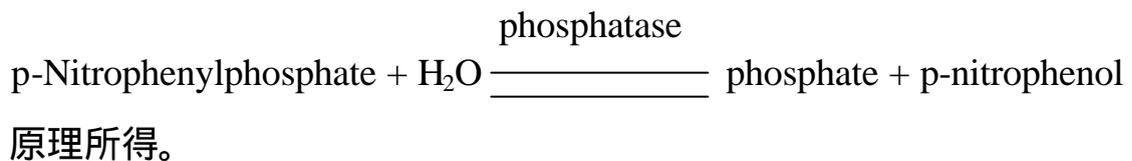
#### 5. 肌酸的檢測 (Creatinine：單位 mg/dL)：

將檢體(尿液/血液)從-80°C 冰箱中取出，使其溶解，然後將檢體稀釋 50 倍 (取 4  $\mu$ l 的檢體加入 196  $\mu$ l 的一次水中)，再將稀釋好的檢體取 20  $\mu$ l 到 96 孔的盤子中，並製備作用試劑(Working Reagent)，Sodium hydroxide 與一次水以 1：4 的比例混合，以及製備標準液，將標準液(Standard solution)原液，依序稀釋 2 倍、4 倍、10 倍以及 20 倍，最後利

用 Microplate Reader (波長 490 nm)進行檢測，在檢測之前才將作用試劑加入 96 孔盤中 (每一個為 200  $\mu$ l)，加入作用試劑後檢測一次，過 2 分鐘之後再檢測第二次。

#### 6. 鹼性磷酸酵素的檢測(Alkaline Phosphatase : 單位 U/I) :

取 4  $\mu$ l 的樣本與 200  $\mu$ l 的作用試劑(Working reagent, 商售 Human Kit)混合均勻，利用波長 405 nm 經過 1 分鐘、2 分鐘以及 3 分鐘後各檢測一次，總共檢測三次，藉由三次檢測的數據換算其每分鐘顏色改變的情形(  $A/min$ )，然後乘上常數 3433 即為鹼性磷酸酵素的檢測數據(單位 U/I)，此實驗檢測方法是利用



#### 7. Deoxypyridinoline Crosslinks (DPD)檢測 (單位 mole/L) :

將尿液、標準液以及控制液利用分析溶液(Assay Buffer)稀釋 10 倍(取 50  $\mu$ l 的尿液加入 450  $\mu$ l 分析溶液中)，並將稀釋過的尿液、標準液以及控制液取出 50  $\mu$ l，逐一加到 96 孔盤中，然後再加入 100  $\mu$ l 的酵素試劑(Enzyme Conjugate)，貼上透明膠帶然後在 2-8 $^{\circ}$ C 黑暗處反應 2 個小時，反應完後利用一倍的洗滌液沖洗 3 次，清洗完後每一孔再加入 150  $\mu$ l 的作用受質溶液(Working Substrate Solution)，同樣的貼上透明膠帶，於室溫下作用 60 分鐘，作用完後將透明膠帶撕掉，加入 100  $\mu$ l 的停止反

應溶液(Stop Solution), 然後在 15 分鐘內利用 Microplate Reader (波長 405 nm)檢測分析。

## 七、 統計方法：

本實驗所使用的統計方法為 Student's t-test, 當  $P < 0.05$  則具有統計上的意義, 以及利用 two-way ANOVA (analysis of variance)分析補充雌激素對於卵巢切除老鼠尿中 DPD 的影響。

## 肆、結果：

卵巢切除的老鼠感染 *Pg* 菌之後，發現其毛髮比控制組較不滑順，而且在實驗接觸的過程中，發現其體溫也較控制組高、活力也比較差。實驗過程中每週注射 *Pg* 菌一次，並且每週定期收集尿液一次，總共為期二個月最後進行尿液檢測分析。

### *Pg* 菌感染對於卵巢切除老鼠全身性骨頭的影響：

鹼性磷酸酵素與成骨細胞有關，因此本實驗首先分析卵巢切除老鼠其尿液中的鹼性磷酸酵素含量(見圖五)，結果顯示當感染 *Pg* 菌後的第 10 天，發現老鼠尿液中的鹼性磷酸酵素有顯著的差異，卵巢切除老鼠注射活的 *Pg* 菌，其尿液中鹼性磷酸酵素值為  $6.51 \pm 5.53$  (U/I) / (mg/dL) 大於控制組的  $1.20 \pm 1.43$  (U/I) / (mg/dL)，注射死的 *Pg* 菌其值為  $5.68 \pm 3.08$  (U/I) / (mg/dL) 大於控制組的  $1.20 \pm 1.43$  (U/I) / (mg/dL) ( $p < 0.05$ )，而其它的時間點則沒有發現到顯著的差異。另外尿液中鈣的檢測(見圖六)，在第 17 天時發現到，實驗組注射活 *Pg* 菌的老鼠以及死 *Pg* 菌的老鼠其尿液中鈣的含量都和控制組有顯著的差異，注射活 *Pg* 菌的老鼠其尿液中鈣的含量為  $0.0988 \pm 0.05$  (mg/dL) / (mg/dL) 較控制組的  $0.0362 \pm 0.00$  (mg/dL) / (mg/dL) 高( $p < 0.05$ )，而注射死 *Pg* 菌的老鼠其尿液中鈣的含量為  $0.1530 \pm 0.05$  (mg/dL) / (mg/dL) 也較控制組的  $0.0362 \pm 0.00$  (mg/dL) / (mg/dL) 高( $p < 0.05$ )，而在其它的時間點上則由於個體差異太大所以並沒有發現到差異性。

DPD 為另外一項檢測骨頭流失的生化指標，它對於骨頭具有相當的專一性，所以本實驗對於老鼠的尿液進行 DPD 的檢測(見圖七)，結果發現在第 10、14 以及 28 天時都發現到實驗組與控制組有顯著的差異，第 10 天注射活 *Pg* 菌的老鼠其 DPD 值為  $1.81 \pm 0.277$  nmol / mmol，而注射死 *Pg* 菌的老鼠其值為  $2.76 \pm 1.048$  nmol / mmol，這兩組實驗組的 DPD 值都較控制組的 DPD 值  $1.28 \pm 0.182$  nmol / mmol 高( $p < 0.05$ )，同樣的在第 14 天注射活的 *Pg* 菌老鼠其 DPD 值為  $2.75 \pm 0.558$  nmol / mmol，注射死 *Pg* 菌老鼠的 DPD 值為  $4.05 \pm 1.020$  nmol / mmol，也都比控制組的 DPD 值  $1.87 \pm 0.279$  nmol / mmol 還要高( $p < 0.05$ )，而在第四週(28 天)注射活 *Pg* 菌老鼠的值為  $2.82 \pm 2.029$  nmol / mmol，注射死 *Pg* 菌老鼠的值為  $2.38 \pm 0.541$  nmol / mmol，同樣的也較控制組的  $1.48 \pm 0.633$  nmol / mmol 高(只有死菌組與控制組  $p < 0.05$ )。除了檢測骨頭流失的生化指標之外，本實驗還將老鼠進行全身性骨頭灰化，再檢測其單位體重中鈣的含量(見圖八)，結果發現實驗組注射活 *Pg* 菌的老鼠其全身鈣的含量較控制組低，其值為實驗組  $16.6 \pm 0.90$  mg / dL  $\times g$  低於控制組的  $18.2 \pm 0.10$  mg / dL  $\times g$ ，其間並有顯著的差異( $p < 0.05$ )。

#### 補充雌激素對於感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠其骨頭的影響：

在卵巢切除老鼠中注射 *Pg* 菌，發現老鼠除了因為卵巢切除所造成的骨頭流失之外，*Pg* 菌的感染也會加重老鼠全身性骨頭的流失，因此

在下個實驗中我們將雌激素補充到老鼠體內，探討雌激素的補充是否會保護卵巢切除老鼠因 *Pg* 菌的感染所造成的骨頭流失，本實驗檢測老鼠尿液中 DPD 的含量(見圖九)，實驗結果發現，卵巢切除的老鼠加上 *Pg* 菌的感染其尿液中 DPD 的含量相較於未感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠較高，此實驗結果與先前的實驗結果相同，也就是卵巢切除的老鼠加上 *Pg* 菌的感染會加重老鼠全身性骨頭的流失，而將雌激素補充到老鼠體內則發現到，卵巢切除老鼠加上 *Pg* 菌的感染其尿液中 DPD 的含量會隨著時間的增加而增加，但在未感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠中，則發現到其尿液中 DPD 的含量並沒有隨著時間的增加而增加，然而比較感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠，補充雌激素與否對於骨頭保護的情形為何，發現到未補充雌激素的卵巢切除老鼠其尿液中 DPD 的含量會較補充雌激素的卵巢切除老鼠高，而在同樣未感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠中，則發現補充雌激素的卵巢切除老鼠其尿液中的 DPD 含量較未補充雌激素的卵巢切除老鼠低，最後將老鼠進行全身性骨頭灰化，然後測量其全身鈣的含量(見圖十)，結果發現卵巢切除的老鼠當感染 *Pg* 菌時，其全身鈣的含量會較卵巢切除的老鼠但未感染 *Pg* 菌低( $16.6282 \pm 1.9975 \text{ mg / dL } \times$   $18.1691 \pm 0.1142 \text{ mg / dL } \times$ )，然而當卵巢切除的老鼠補充雌激素時發現，未感染 *Pg* 菌的老鼠若補充雌激素則全身鈣的含量會較未補充雌激素的老鼠高( $19.3287 \pm 3.7614 \text{ mg / dL } \times > 18.1691 \pm 0.1142 \text{ mg / dL } \times$ )，而在感

染 *Pg* 菌同時補充雌激素的實驗中發現，同樣感染 *Pg* 菌的老鼠，當補充雌激素則其全身鈣的含量會較未補充雌激素的老鼠高( $18.9815 \pm 0.00 \text{ mg / dL}$   $\times$   $16.6282 \pm 1.9975 \text{ mg / dL}$   $\times$ )，因此從實驗中可以發現雌激素會部分保護卵巢切除的老鼠因 *Pg* 菌的感染所造成的骨頭流失。

#### 局部感染 *Pg* 菌對於正常老鼠全身骨頭的影響：

當卵巢切除的老鼠感染 *Pg* 菌時發現會加重老鼠骨頭的流失，若將雌激素補充到老鼠體內，則會部分保護老鼠骨頭的流失，因此本研究最後進一步探討局部感染 *Pg* 菌是否會造成正常老鼠(未進行卵巢切除)全身性骨頭的流失，實驗結果發現(見圖十一)，老鼠尿液中鹼性磷酸酵素在第 2 週有顯著的差異，感染活 *Pg* 菌的老鼠其值為  $0.2655 \pm 0.03 \text{ UI / (mg/dL)}$ 、感染死 *Pg* 菌的老鼠其值為  $0.1073 \pm 0.03 \text{ UI / (mg/dL)}$ ，這兩組的實驗結果都較控制組的值  $0.0521 \pm 0.00 \text{ UI / (mg/dL)}$  高( $p < 0.05$ )。尿液中鈣的含量發現(見圖十二)，在第 2、4 以及 6 週中實驗組都和控制組有顯著的差異，第 2 週感染活 *Pg* 菌的老鼠其值為  $0.1150 \pm 0.0212 \text{ (mg/dL) / (mg/dL)}$ 、感染死 *Pg* 菌的老鼠其值為  $0.1400 \pm 0.0283 \text{ (mg/dL) / (mg/dL)}$ ，較控制組的值  $0.115 \pm 0.0212 \text{ (mg/dL) / (mg/dL)}$  高(只有死菌組與控制組  $p < 0.05$ )，第 4 週感染活 *Pg* 菌的老鼠其值為  $0.0800 \pm 0.0141 \text{ (mg/dL) / (mg/dL)}$ 、感染死 *Pg* 菌的老鼠其值為  $0.0800 \pm 0.00 \text{ (mg/dL) / (mg/dL)}$ ，較控制組的值  $0.0141 \pm 0.01 \text{ (mg/dL) / (mg/dL)}$  高( $p < 0.05$ )，第 6 週同樣也發現

到感染活 *Pg* 菌的老鼠其值為  $0.10500 \pm 0.00707$  (mg/dL) / (mg/dL) 感染死 *Pg* 菌的老鼠其值為  $0.10500 \pm 0.00707$  (mg/dL) / (mg/dL) , 較控制組的值  $0.105 \pm 0.0071$  (mg/dL) / (mg/dL) 高( $p < 0.05$ )。而尿液中磷的檢測發現(見圖十三), 在第 2 週、第 4 週以及第 6 週中其實驗結果並沒有差異性。然而在尿液中 DPD 的檢測發現(見圖十四), 在第 2 週、第 4 週以及第 6 週中其實驗結果都有顯著的差異性, 第 2 週感染活 *Pg* 菌的老鼠其值為  $14.94 \pm 0.01$  nmol / mmol 感染死 *Pg* 菌的老鼠其值為  $26.03 \pm 13.34$  nmol / mmol , 較控制組的值  $8.00 \pm 0.00$  nmol / mmol 高( $p < 0.05$ ) , 第 4 週感染活 *Pg* 菌的老鼠其值為  $20.87 \pm 1.46$  nmol / mmol 感染死 *Pg* 菌的老鼠其值為  $24.19 \pm 2.74$  nmol / mmol , 較控制組的值  $9.10 \pm 0.00$  nmol / mmol 高( $p < 0.05$ ) , 第 6 週同樣也發現到感染活 *Pg* 菌的老鼠其值為  $34.00 \pm 8.76$  nmol / mmol 感染死 *Pg* 菌的老鼠其值為  $23.13 \pm 0.02$  nmol / mmol, 較控制組的值  $9.10 \pm 0.00$  nmol / mmol 高( $p < 0.05$ )。最後全身性鈣的含量發現(見圖十五), 當正常的老鼠感染 *Pg* 菌時其全身鈣的含量會較控制組低, 而且有顯著的差異, 實驗組全身鈣的含量為  $18.1 \pm 1.544$  mg / dL 較控制組的值  $24.2 \pm 0.598$  mg / dL 低( $p < 0.05$ ) , 因此在這實驗中發現局部感染 *Pg* 菌時會造成正常老鼠骨頭的流失。

## 伍、討論：

從本研究中可以得知，牙周致病菌 *Pg* 的感染會加重卵巢切除老鼠全身性骨頭的流失，而補充雌激素後，會部分保護卵巢切除老鼠因 *Pg* 菌感染所造成的骨頭流失，而且局部 *Pg* 菌的感染也會造成正常老鼠全身性骨頭的流失，因此由上述的實驗結果可以印證先前的實驗假說『牙周致病菌 *Porphyromonas gingivalis* 感染會造成老鼠全身性骨頭流失』。

骨頭吸收與骨頭形成使得生物體內的骨頭不斷的新陳代謝，蝕骨細胞將舊的骨頭吸收，而成骨細胞在骨頭吸收的地方進行礦化作用產生新的骨頭，所以當體內這兩種細胞活性功能達到平衡時，骨頭便可以維持正常，當蝕骨細胞活性功能多於成骨細胞時，便會造成骨頭流失的疾病像是骨質疏鬆症，而當成骨細胞活性功能大於蝕骨細胞時，則會造成骨質石化病(osteopetrosis)，因此要了解體內骨頭吸收的情形為何，便需要藉由一些生物標記來檢測，像是骨頭吸收的生物標記就有蝕骨細胞的活性、第一型膠原蛋白(type 1 collagen 包括 N-telopeptides, C-telopeptides, hydroxyproline)和 collagen crosslinks pyridinoline、deoxypyridinoline (DPD)、酸性磷酸酵素(蝕骨細胞活性的標記)以及尿液中鈣的含量。而骨頭形成的生物標記包括：成骨細胞活性、骨鈣蛋白質(osteocalcin)、鹼性磷酸酵素和前膠原蛋白(procollagen：反應骨頭中有機基質的形成)的 N-terminal 及 C-terminal extension peptides (60)。而本篇實驗中除了選擇

鈣、磷、鹼性磷酸酵素以及 DPD 作為檢測骨頭的生物標記之外，也做了骨頭拉力強度的試驗，但由於本實驗的動物模型為 BALB/c 小鼠，所以在多次的試驗中都無法完成骨頭密度的試驗，再加上其他動物模型研究中，發現骨頭密度測試的試驗都是利用大型動物做為研究的對象 (61)，所以最後本實驗選擇研究老鼠全身灰化，測量其單位體重中鈣的含量，以進一步了解老鼠骨頭流失的淨結果。

在牙周致病菌 *Pg* 感染是否會加重卵巢切除老鼠骨頭流失的實驗中，發現到鹼性磷酸酵素在第 10 天時有顯著的差異，但在其它的時間點則沒有發現到差異性，鹼性磷酸酵素與成骨細胞有關，主要來自肝臟與骨骼。可能 *Pg* 菌的感染之後，細菌本身從局部的地方藉由血液運送到全身，然後刺激骨頭細胞產生鹼性磷酸酵素，以維持體內骨頭的平衡，而細菌從局部的地方藉由血液到達全身，然後激發成骨細胞產生作用，因此實驗才會在第 10 天發現到鹼性磷酸酵素的增加。而尿液中鈣的檢測，在實驗的第 17 天時鈣才有顯著的差異，其它的時間點並沒有顯著的差異，實驗結果推測，一般探討骨頭流失都會進行尿液中鈣含量的檢測，鈣的代謝受到內分泌副甲狀腺(PTH)、抑鈣素(calcitonin)、腎臟、胃腸、維生素 D<sub>3</sub>、血液酸鹼度以及營養狀態的影響，食物中若缺少鈣質，將導致血鈣降低，並使得骨骼鈣析出，引起骨骼異常，而副甲狀腺會刺激腎臟合成維生素 D<sub>3</sub>使小腸增加鈣吸收，減少腎臟鈣排泄，然而維生

素  $D_3$  在肝臟或腎臟活化成 1,25-dihydroxy-  $D_3$  後，才會促進胃腸吸收鈣、磷(62)，由於鈣的濃度會受到其他因子的影響，再加上實驗個體差異性大，所以本實驗才會只有在第 17 天看到顯著的差異。本實驗除了鈣以及鹼性磷酸酶的檢測之外，還利用另外一個對骨頭專一性以及特異性很強的生物標記 DPD 來進行檢測，因為 DPD 只存在於骨質中，它是一種胺基酸衍生物，為骨骼的第一型膠原(type collagen)中之成份，DPD 在鄰接膠原分子間形成交叉狀結構產生強度張力，所以當骨質發生分解時，DPD 從膠原組織釋放出來，不會重複利用或被肝臟代謝，然後由尿液排出，其排出 DPD 的量可以反映骨質流失的速率，測定尿中 DPD 濃度，不受飲食或運動影響，因此可以更精確的瞭解骨質週轉率的情形(63)。實驗結果發現在第 14、28 以及 33 天，*Pg* 感染的實驗組其 DPD 的含量都較控制組有顯著的差異。除了檢測骨頭生物標記之外，本篇實驗還進行老鼠全身灰化，測量其單位體重中鈣的含量，實驗結果發現，卵巢切除的老鼠當感染 *Pg* 菌時其全身性鈣的含量會明顯的減少，但是由於個體差異太大所以並沒有統計上的意義。

在補充雌激素是否會保護卵巢切除的老鼠，因 *Pg* 菌感染所造成的骨頭流失實驗中，從老鼠尿液中 DPD 的檢測中發現到，感染 *Pg* 菌且未補充雌激素的卵巢切除老鼠其尿液中 DPD 的含量較補充雌激素的卵巢切除老鼠高，而在同樣未感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠中，則發現補充雌

激素的卵巢切除老鼠其尿液中的 DPD 含量較未補充雌激素的卵巢切除老鼠低，但是在同時補充雌激素的卵巢切除老鼠中發現，未感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠其骨頭流失會受到雌激素的保護，所以卵巢切除老鼠尿液中的 DPD 並沒有隨著時間的增加而增加，然而在感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠的實驗中，發現到雌激素同樣也會保護因感染 *Pg* 菌所造成的骨頭流失，但是卵巢切除老鼠尿中的 DPD 含量反而會隨著時間的增加而增加，尤其在第 45 天時卵巢切除老鼠尿中 DPD 的含量最高。除了 DPD 的檢測之外，在全身性鈣的含量中發現到，卵巢切除的老鼠再加上 *Pg* 菌感染會加重卵巢切除老鼠骨頭的流失，然而將卵巢切除的老鼠補充雌激素時，則發現卵巢切除的老鼠其骨頭流失的情形會受到保護，而感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠若補充雌激素時，同樣的也發現到老鼠骨頭流失的情形受到保護，但當比較同時都有補充雌激素的卵巢切除老鼠，則感染 *Pg* 菌與未感染 *Pg* 菌的老鼠其骨頭流失的情形並沒有差異性，從卵巢切除老鼠尿液中 DPD 以及全身性鈣的檢測中，我們推測卵巢切除造成老鼠的全身性骨頭流失的機轉與 *Pg* 菌感染加重卵巢切除老鼠全身性骨頭流失的機轉不同，所以實驗結果才會發現到，感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠補充雌激素時，其尿液中的 DPD 含量相較於未補充雌激素的卵巢切除老鼠低，但 DPD 的含量卻還是會隨著時間的增加而增加，除此之外，在感染 *Pg* 菌與未感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠中，檢測結果發現全身

性鈣的含量並沒有差異性。

在局部感染 *Pg* 菌是否會造成正常老鼠全身性骨頭流失的實驗中，檢測鹼性磷酸酵素發現，在第二週時其比值有顯著的差異，到了第四、第六週時則沒有顯著的差異，但結果仍然比控制組多，這樣的實驗結果和第一個實驗結果相同，鹼性磷酸酵素只有在第二週左右時才有顯著的差異，之後便沒有差異性產生。而在鈣的檢測中，同樣的也發現到實驗有差異性產生，不管是第二週或是第四、第六週都可以看到局部 *Pg* 菌的感染其尿液中鈣的含量都較控制組有顯著的差異，而其中第二週時其尿液中鈣的含量較高，這樣的實驗結果和鹼性磷酸酵素的時間點相同，推測當 *Pg* 菌感染之後身體產生了免疫反應，而此免疫反應造成老鼠的骨頭流失，但是老鼠體內為了要維持骨骼的平衡，所以此時體內成骨細胞會作用產生鹼性磷酸酵素，因此在第二週鹼性磷酸酵素有明顯的增加而且有顯著的差異。在另一項尿液檢測實驗中，發現到尿液中 DPD 的含量有顯著的差異，在第二、第四以及第六週中，都可以發現到 *Pg* 菌感染的老鼠其尿液中 DPD 的含量較控制組有顯著的差異，而且實驗結果也發現到，不管在那一個時間點其控制組的 DPD 含量都並沒有很大的差異性，反而在 *Pg* 菌感染的實驗組中發現到，尿液中 DPD 的含量會隨著時間的增加而增加，所以從這個實驗結果可以得知 *Pg* 菌的感染會不斷的影響老鼠體內骨頭的流失。最後在全身性鈣的檢測中，更發現到

*Pg* 菌感染的確會造成正常老鼠全身性骨頭的流失，而且具有統計上的意義。

在臨床生化上對於患者骨頭流失的檢測中，大多採用鈣、磷以及鹼性磷酸酵素的檢測，並利用肌酸作為比值以避免因尿量的多寡而影響到結果的準確性，然而近幾年的研究中，研發出一種對於骨頭更具專一性以及特異性的生化標記-DPD,目前已經有許多的研究都採用此生化標記作為骨頭流失檢測的依據，像是骨質疏鬆症(64)、Paget's 疾病(65)、副甲狀腺機能亢進(primary hyperparathyroidism) (65)、甲狀腺機能亢進(hyperthyroidism) (66)以及惡性高鈣血症(malignant hypercalcemia) (67)等各種會影響骨頭代謝的疾病，而且在動物模型中同樣也有利用 DPD 來研究骨質疏鬆症的實驗，像是 1997 年 Johnson 就利用 DPD 做為檢測骨頭流失的生化標記之一，建立羊的動物模型進而從事骨質疏鬆症的研究(68)。除了骨頭生化標記的檢測之外，還會針對患者做局部或是全身性 X 光片照射，以進一步觀察患者骨頭流失的情形為何，在本實驗中，我們同樣針對老鼠做全身性 X 光片的照射(7mA 60Kv 的電流曝光時間 0.12 秒)，將老鼠固定於木板中腹部朝下，但是結果沒有發現老鼠全身性骨頭的 X 光片有差異性。除此之外，在一般的動物實驗中，可以發現到有研究將動物的局部骨頭進行灰化，測量其局部骨頭鈣的含量，由於此動物實驗多數為較大型的動物，所以只能將動物局部骨頭取下進行灰化

(69)，然而在本實驗中由於所研究的動物為小鼠(BALB/c)，所以本研究採用全身性骨頭灰化實驗，測量老鼠單位體重中全身性鈣的含量，此實驗結果可以讓我們進一步了解到老鼠體內骨頭流失的淨結果。為了更準確探討牙周致病菌感染對於老鼠骨頭流失的情形，本研究針對老鼠骨頭流失做了生化標記、機械性物理性質、X光片照射以及全身性鈣的檢測等實驗，未來我們計畫加入組織切片實驗，在組織切片實驗中可以計算骨頭中蝕骨細胞以及成骨細胞的數目，也可以探討緻密骨(cortical bone)以及海綿骨(trabecular bone)骨頭流失的情形，如此一來便可以藉由不同實驗的方法得到更精確的實驗結果。

本實驗在鈣與鹼性磷酸酵素的檢測中發現到，鹼性磷酸酵素在第 10 天與控制組才有顯著的差異，而鈣在第 17 天與控制組也有顯著的差異，因此我們推測成骨細胞活性增加，所以發現到尿液中的鈣以及鹼性磷酸酵素有顯著的差異，而成骨細胞活性的增加是因為發炎調控因子被活化，然而發炎調控因子的活化其來源是因為牙周致病菌的感染藉由血液運送至全身，誘導骨頭附近的發炎細胞產生發炎調控因子所致。1998 年 Haraszthy 的研究中，發現到在動脈粥狀硬化而且患有嚴重牙周病患者中，有 42% 的患者血管粥狀瘤附近發現到一種或是數種牙周致病菌的存在(70)。而 Deshpande 的研究中也發現到，在體外實驗中 *Pg* 菌會侵入而且黏附在胎牛心臟的內皮細胞以及主動脈的內皮細胞，在人體的肚臍

靜脈內皮細胞中也同樣發現到 *Pg* 菌的侵入與黏附(71)。藉由這些實驗結果可以支持牙周致病菌會透過血液循環而到達全身，進而影響到全身性骨頭的流失，而且在本實驗室的另外一項研究中也發現到，當老鼠感染 *Pg* 菌之後，其血液中的 IFN- $\gamma$  以及 PGE<sub>2</sub> 都有顯著的增加，除此之外血液中鈣的檢測，同樣也發現到實驗組血液中鈣的含量相較於控制組高(結果未附)。從這些實驗結果，我們可以推論牙周致病菌會藉由血液循環運送到全身，引起動物體內的免疫反應，進而增加發炎細胞激素的產生，最後而影響全身性骨頭的流失。

由於臨床人體試驗容易受到其它因素的影響，所以建立一個動物模型從事基礎研究，有助於釐清影響疾病的相關因子，在骨質疏鬆症的研究中，常常受到以下因素的影響，像是年齡、數量、停經以及生活習慣(例如：抽煙、喝酒)等。而在 2001 年 Lundstrom 的研究中，比較骨質疏鬆症婦女與正常者之間其牙周健康狀況，實驗結果發現骨質疏鬆症婦女其牙齦出血、囊袋深度、牙齦退縮(gingival recession)以及齒槽骨緣(marginal bone)等牙周健康狀況，都與正常婦女無顯著的差異，而其推論為受測者的數目太少，所以無法正確的判斷兩者之間是否有關聯性(72)。然而本實驗利用動物模型進行研究的對象，有助於控制實驗對象的數目以及年齡等問題，而利用皮下植入線圈可以模擬人體臨床上牙周病屬於慢性局部發炎疾病，再加上選用 *Pg* A7436 這個菌種因具有毒性

以及高侵襲性，有助於本實驗探討牙周致病菌對於全身性骨頭的影響，而將老鼠卵巢切除可以模擬人體停經後的生理狀況，所以在這些相關因子的控制之下，便可以釐清牙周致病菌對於全身性骨頭的影響。

最後實驗結果發現牙周致病菌 *Pg* 的感染的確會造成正常老鼠全身性骨頭的流失，如果將老鼠卵巢切除的話，可以發現 *Pg* 菌的感染會加重老鼠全身性骨頭的流失，而在此時將雌激素補充進入體內，則發現雌激素會部分保護因 *Pg* 菌感染所造成的全身性骨頭流失。藉由實驗結果可以推測，臨床上如果人體患有牙周病再加上其為停經後的婦女，則其罹患骨質疏鬆症的危險性可能會提高許多，如果此時可以經由牙醫師定期的牙周病治療，也許可以改善其因牙周病所導致的骨頭流失，而在這些相關治療以及預防之下，也許可以預防因骨質疏鬆症而導致人體骨折的危險性。但這樣的推論還需要更多的流行病學與基礎研究以及相關的臨床試驗做配合，因此本實驗未來研究的方向，將繼續利用此動物模型做為研究的對象，以本實驗的結果做為基礎，將細菌感染的部位移至口腔牙齦上，讓動物模型可以更加貼近臨床上的牙周病狀態，藉由動物模型的不斷改善，以便於日後可以將此動物模型的實驗結果延伸至大型靈長類動物，以及由原先單株牙周致病菌的感染變為多種菌株感染，讓動物實驗可以更趨向於人體實驗，除此之外在人體實驗中可以得知，若補充雌激素和黃體激素可以預防婦女因停經後所造成的骨質疏鬆症，而適

度的運動以及飲食的補充(1994年 National Institutes of Health Consensus Development Conference 建議停經前的女性每天補充鈣的攝取量為 1000 mg，停經後的女性為每天補充攝取 1500 mg，而停經後的女性維他命 D 的建議攝取量為 200 IU/day(73)。也都可以預防骨質疏鬆症，因此未來的研究也可以進一步探討這些預防方法，是否也可以預防因牙周致病菌感染所造成的全身性骨頭流失，以達到最終人體口腔以及全身骨骼健康的預防保健。

## 陸、結論：

牙周致病菌 *Porphyromonas gingivalis* 感染會加重卵巢切除老鼠全身性骨頭的流失，當雌激素補充到卵巢切除老鼠體內，則會部分保護因 *Porphyromonas gingivalis* 菌感染所造成的骨頭流失；而局部感染 *Porphyromonas gingivalis* 菌時也會造成正常老鼠全身性骨頭的流失。

## 柒、參考資料：

1. Melton LJ 3<sup>rd</sup>. How many women have osteoporosis now? *Journal of Bone & Mineral Research*. 10(2):175-177, 1995
2. Kanis JA, Melton LJ 3<sup>rd</sup>, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N. The diagnosis of osteoporosis. *Journal of Bone & Mineral Research*. 9(8):1137-1141, 1994
3. Cooper C. Magnitude and impact of osteoporosis and fractures. In *Osteoporosis* Edited by Marcus R. San Diego: Academic Press. 419-434: 1996
4. Aaron JE, Makins NB, Sagreiya K. The microanatomy of trabecular bone loss in normal aging men and women. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. (215):260-271, 1987
5. Anderson JJ, Pollitzer WS. Ethnic and genetic differences in susceptibility to osteoporotic fractures. *Advances in Nutritional Research*. 9:129-149, 1994
6. Ensrud KE, Palermo L, Black DM, Cauley J, Jergas M, Orwoll ES, Nevitt MC, Fox KM, Cummings SR. Hip and calcaneal bone loss increase with advancing age: longitudinal results from the study of osteoporotic fractures. *Journal of Bone & Mineral Research*. 10(11):1778-1787, 1995
7. Krall EA, Dawson-Hughes B. Smoking and bone loss among postmenopausal women. *Journal of Bone & Mineral Research*. 6(4):331-338, 1991
8. Stevenson JC, Lees B, Devenport M, Cust MP, Ganger KF. Determinants of bone density in normal women: risk factors for future osteoporosis? *British Medical Journal*. 298(6678):924-928, 1989
9. Bressot C. Histomorphometric profile, pathophysiology and reversibility

- of corticosteroid-induced osteoporosis. *Metabolic Bone Disease & Related Research. 1: 303-319, 1979*
10. Baylink DJ. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *New England Journal of Medicine. 309(5):306-308, 1983*
  11. Dawson-Hughes B, Dallal GE, Krall EA, Sadowski L, Sahyoun N, Tannenbaum S. A controlled trial of the effect of calcium supplementation on bone density in postmenopausal women. *New England Journal of Medicine. 323(13):878-883, 1990*
  12. Lukert B, Higgins J, Stoskopf M. Menopausal bone loss is partially regulated by dietary intake of vitamin D. *Calcified Tissue International. 51(3):173-179, 1992*
  13. Abelow BJ, Holford TR, Insogna KL. Cross-cultural association between dietary animal protein and hip fracture: a hypothesis. *Calcified Tissue International. 50(1):14-18, 1992*
  14. Tsai KS. Osteoporotic fracture rate, bone mineral density, and bone metabolism in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association. 96(10):802-805, 1997*
  15. Tsai KS, Cheng WC, Sanchez TV, Chen CK, Chieng PU, Yang RS. Bone densitometry of proximal femur in Chinese subjects: gender differences in bone mass and bone areas. *Bone. 20(4):365-369, 1997*
  16. Albright F. Postmenopausal osteoporosis. *JAMA. 116: 2465-2474, 1941*
  17. Tsai KS, Huang KM, Chieng PU, Su CT. Bone mineral density of normal Chinese women in Taiwan. *Calcified Tissue International. 48:161-166, 1991*
  18. Tsai KS, Pan WH, Hsu SH, Cheng WC, Chen CK, Chieng PU, Yang RS, Twu ST. Sexual differences in bone markers and bone mineral density of

- normal Chinese. *Calcified Tissue International*. 59(6):454-460, 1996
19. Tsai KS. The effect of bone area on spinal densitometry in Chinese men and women. *Bone*:20, 1997
  20. Tsai KS, Cheng WC, Sanchez TV, Chen CK, Chieng PU, Yang RS. Bone densitometry of proximal femur in Chinese subjects: gender differences in bone mass and bone areas. *Bone*. 20(4):365-369, 1997
  21. Riggs BL, Melton LJ 3rd. Involutional osteoporosis. *New England Journal of Medicine*. 314(26):1676-1686, 1986
  22. Tsai K, Twu S, Chieng P, Yang R, Lee T. Prevalence of vertebral fractures in Chinese men and women in urban Taiwanese communities. *Calcified Tissue International*. 59(4):249-253, 1996
  23. Kribbs PJ. Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 63(2):218-222, 1990
  24. Kribbs PJ, Chesnut CH 3rd, Ott SM, Kilcoyne RF. Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 62(6):703-707, 1989
  25. von Wowern N, Klausen B, Kollerup G. Osteoporosis: a risk factor in periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 65(12):1134-1138, 1994
  26. Shen SJ. The effect of chronological age and year since menopause on bone mineral density in normal Chinese women. *Clinical Journal of the Radiology*. 19: 39-45 ,1994
  27. Tsai YJ. A Pilot Study on Health Sector Priority Review-by Retrospective Study on the Elderly Hip Fracture in Taiwan (Monograph). Taichung: Taiwan Provincial Institute of Family Planning, 1997
  28. Melton LJ. Hip fractures: a worldwide problem today and tomorrow. *Bone*. 14: 1-8, 1993

29. Projection of the Population of the Taiwan Area, Republic of China 1990 to 2036 { Monograph } . Taipei, ROC: Manpower Planning Dept, Council for Economic Planning and Development, Executive Yuan, :40-48, 1991
30. Xu L, Lu A, Zhao X, Chen X, Cummings SR. Very low rates of hip fracture in Beijing, People's Republic of China the Beijing Osteoporosis Project. *American Journal of Epidemiology*. 144(9):901-907, 1996
31. Page RC, Beck JD. Risk assessment for periodontal diseases. *International Dental Journal*. 47(2):61-87, 1997
32. Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes & Infection*. 2(10):1181-1192, 2000
33. Oliver RC, Brown LJ, Loe H. Periodontal diseases in the United States population. *Journal of Periodontology*. 69(2):269-278, 1998
34. The Research, Science, and Therapy Committee of The American Academy of Periodontology. The pathogenesis of periodontal diseases. *Journal of Periodontology*. 70(4):457-470, 1999
35. Hausmann E, Raisz LG, Miller WA. Endotoxin: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science*. 168(933):862-864, 1970
37. Kadono H, Kido J, Kataoka M, Yamauchi N, Nagata T. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis*. *Infection & Immunity*. 67(6):2841-2846, 1999.
38. Kawata Y, Hanazawa S, Amano S, Murakami Y, Matsumoto T, Nishida K, Kitano S. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae stimulate bone resorption in vitro. *Infection & Immunity*. 62(7):3012-3016, 1994
39. Holt SC, Bramanti TE. Factors in virulence expression and their role in

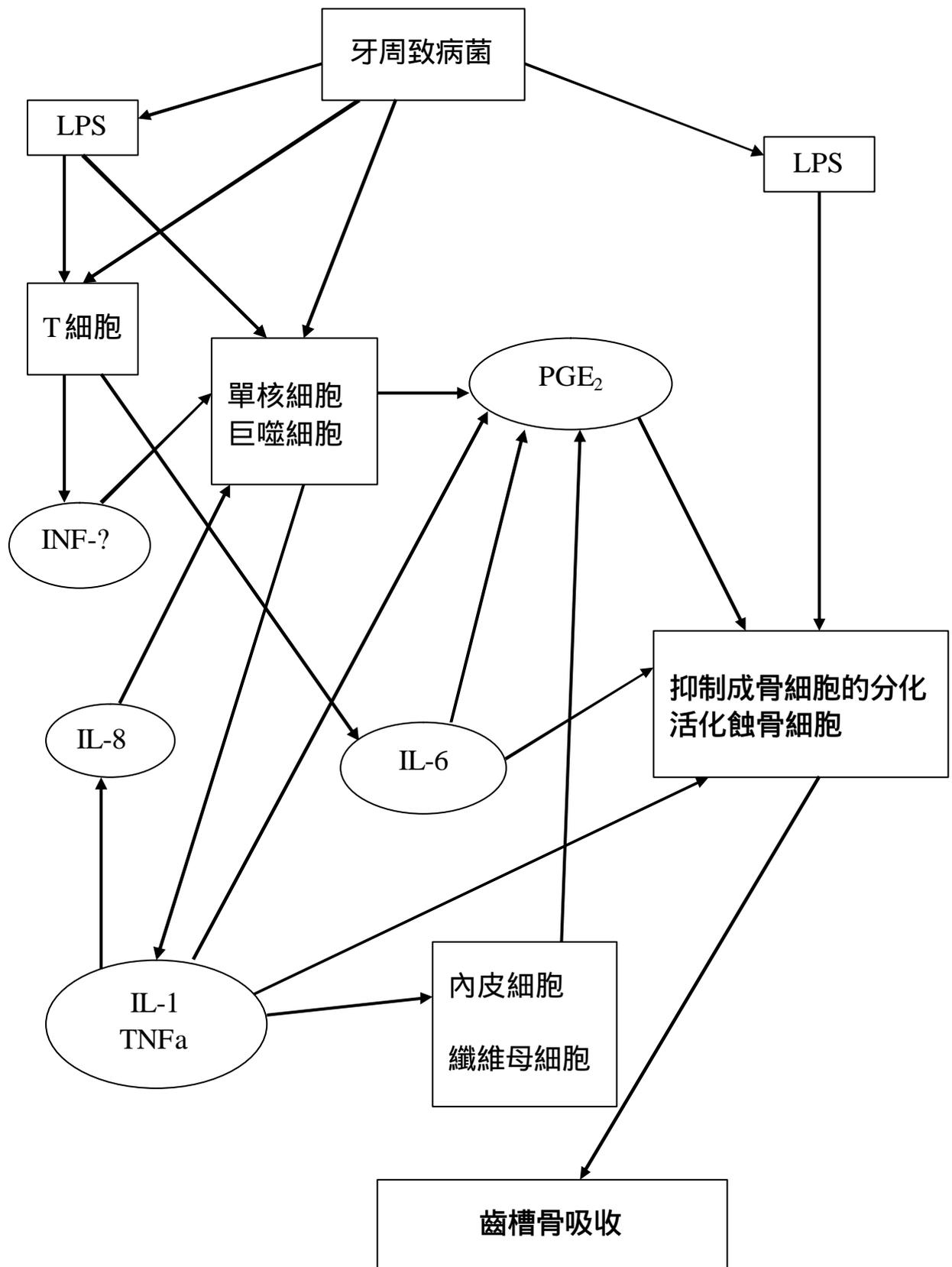
- periodontal disease pathogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2(2):177-281, 1991
40. Birkedal-Hansen H, Taylor RE, Zambon JJ, Barwa PK, Neiders ME. Characterization of collagenolytic activity from strains of *Bacteroides gingivalis*. *Journal of Periodontal Research*. 23(4):258-264, 1988
41. Singer RE. Important components of toxic dental plaque extracts. *Infection & Immunity*. 32: 458-463,1981
42. Robertson PB, Lantz M, Marucha PT, Kornman KS, Trummel CL, Holt SC. Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Periodontal Research*. 17(3):275-283, 1982
43. Holt SC, Ebersole J, Felton J, Brunsvold M, Kornman KS. Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science*. 239(4835):55-57, 1988
44. Evans RT, Klausen B, Ramamurthy NS, Golub LM, Sfantescu C, Genco RJ. Periodontopathic potential of two strains of *Porphyromonas gingivalis* in gnotobiotic rats. *Archives of Oral Biology*. 37(10):813-819, 1992
45. Baker PJ, Evans RT, Roopenian DC. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. *Archives of Oral Biology*. 39(12):1035-1040, 1994
46. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology 2000*. 14:112-143, 1997
47. Jean WW, Grossi SG, Trevisan M, Genco RJ, Tezal M, Dunford RG, Ho

- AW, Hausmann E, Hreshchyshyn MM. The role of osteopenia in oral bone loss and periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 67(10 Suppl):1076-1084, 1996
48. Hidaka S, Okamoto Y, Yamada Y, Miyazaki K, Kimura T. Alterations in the periodontium after ovariectomy in rats: the effects of a Japanese herbal medicine, Chujo-to. *Phytotherapy Research*. 14(7):527-533, 2000
49. Gilles JA, Carnes DL, Dallas MR, Holt SC, Bonewald LF. Oral bone loss is increased in ovariectomized rats. *Journal of Endodontics*. 23(7):419-422, 1997
50. Tezal M, Wactawski-Wende J, Grossi SG, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women. *Journal of Periodontology*. 71(9):1492-1498, 2000
51. Payne JB, Reinhardt RA, Nummikoski PV, Patil KD. Longitudinal alveolar bone loss in postmenopausal osteoporotic/osteopenic women. *Osteoporosis International*. 10(1):34-40, 1999.
52. von Wowern N, Klausen B, Kollerup G. Osteoporosis: a risk factor in periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 65(12):1134-1138, 1994
53. Jandinski JJ, Stashenko P, Feder LS, Leung CC, Peros WJ, Rynar JE, Deasy MJ. Localization of interleukin-1 beta in human periodontal tissue. *Journal of Periodontology*. 62(1):36-43, 1991
54. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Prostack L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 18(7):548-554, 1991
55. Assuma R., Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF

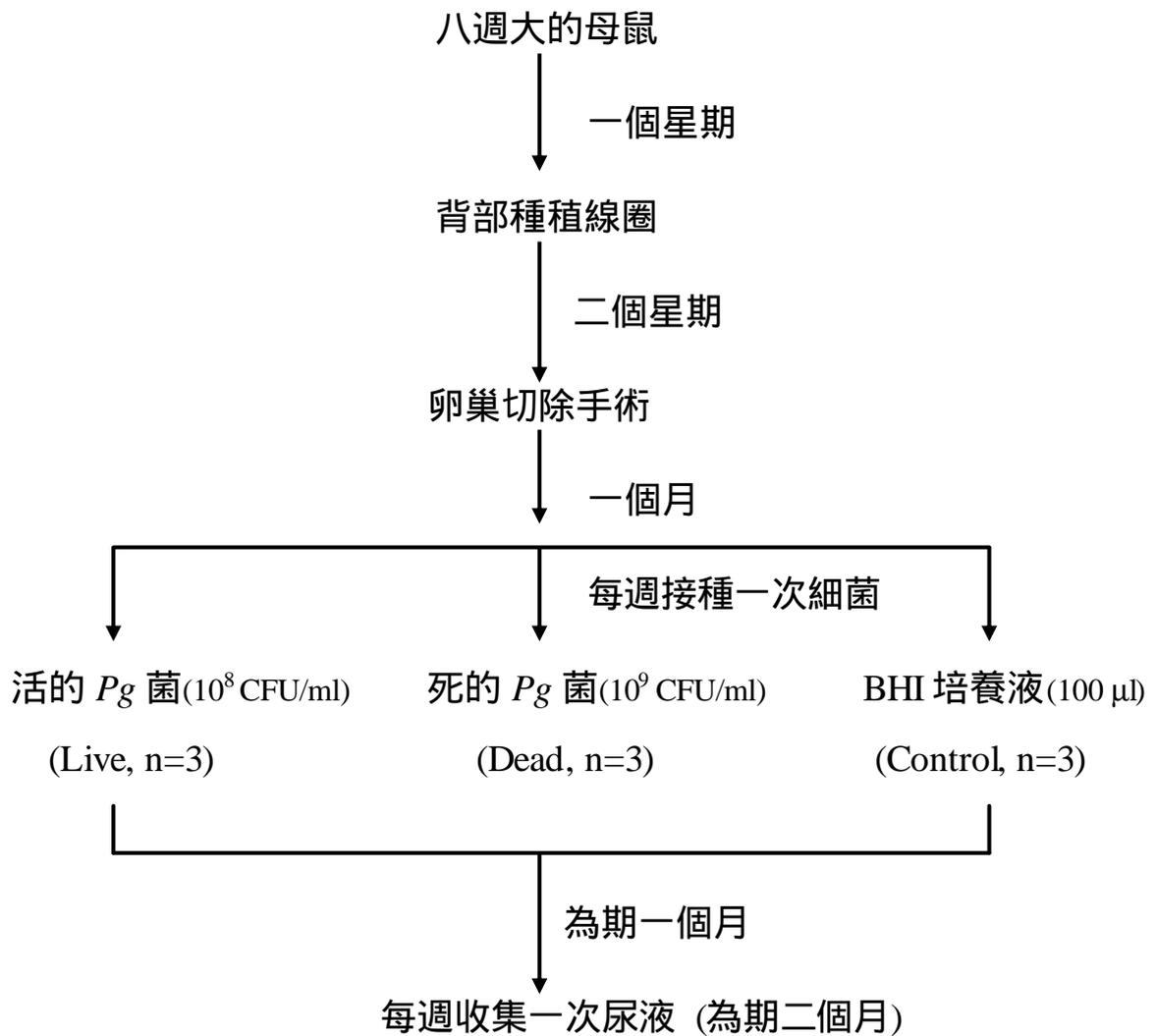
- antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *Journal of Immunology*. 160(1):403-409, 1998
59. Mann GN, Jacobs TW, Buchinsky FJ, Armstrong EC, Li M, Ke HZ, Ma YF, Jee WS, Epstein S. Interferon-gamma causes loss of bone volume in vivo and fails to ameliorate cyclosporin A-induced osteopenia. *Endocrinology*. 135(3):1077-1083, 1994
60. Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clinical Biochemistry*. 30(8):573-593, 1997
61. Omi N, Morikawa N, Ezawa I. The effect of spiny lobster shell powder on bone metabolism in ovariectomized osteoporotic model rats. *Journal of Nutritional Science & Vitaminology*. 38(6):555-563, 1992
62. 何敏夫 編著 , 臨床化學第三版 , 合計圖書出版社, 386-389, 2000
63. 何敏夫 編著 , 臨床化學第三版 , 合計圖書出版社, 223-224, 2000
64. Delmas PD, Schlemmer A, Gineyts E, Riis B, Christiansen C. Urinary excretion of pyridinoline crosslinks correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients with vertebral osteoporosis. *Journal of Bone & Mineral Research*. 6(6):639-644, 1991
65. Uebelhart D, Gineyts E, Chapuy MC, Delmas PD. Urinary excretion of pyridinium crosslinks: a new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone & Mineral*. 8(1):87-96, 1990
66. Harvey RD, McHardy KC, Reid IW, Paterson F, Bewsher PD, Duncan A, Robins SP. Measurement of bone collagen degradation in hyperthyroidism and during thyroxine replacement therapy using pyridinium cross-links as specific urinary markers. *Journal of Clinical*

- Endocrinology & Metabolism. 72(6):1189-1194, 1991*
67. Body JJ, Delmas PD. Urinary pyridinium cross-links as markers of bone resorption in tumor-associated hypercalcemia. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 74(3):471-475, 1992*
68. Johnson RB, Gilbert JA, Cooper RC, Dai X, Newton BI, Tracy RR, West WF, DeMoss TL, Myers PJ, Streckfus CF. Alveolar bone loss one year following ovariectomy in sheep. *Journal of Periodontology. 68(9):864-871, 1997*
69. Omi N, Aoi S, Murata K, Ezawa I. Evaluation of the effect of soybean milk and soybean milk peptide on bone metabolism in the rat model with ovariectomized osteoporosis. *Journal of Nutritional Science & Vitaminology. 40(2):201-211, 1994*
70. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Shah R, Zeid M, Genco RJ. *Journal of Dental Research. Spec. Iss. 77, p.666, abstr. 273, 1998*
71. Deshpande RG, Khan MB, Genco CA. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection & Immunity. 66(11):5337-5343, 1998*
72. Lundstrom A, Jendle J, Stenstrom B, Toss G, Ravald N. Periodontal conditions in 70-year-old women with osteoporosis. *Swedish Dental Journal. 25(3):89-96, 2001.*
73. National Research Council Subcommittee on the Tenth Edition of the RDAs. Recommended dietary allowances: Subcommittee on the Tenth edition of the RDAs, Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences, National Research Council. 10<sup>th</sup> rev.ed. Washington, DC: National Academy Press, 1989.

圖一：牙周致病菌造成齒槽骨吸收的可能機轉簡圖



圖二：Pg 菌感染對於卵巢切除老鼠全身性骨頭影響的實驗簡圖：

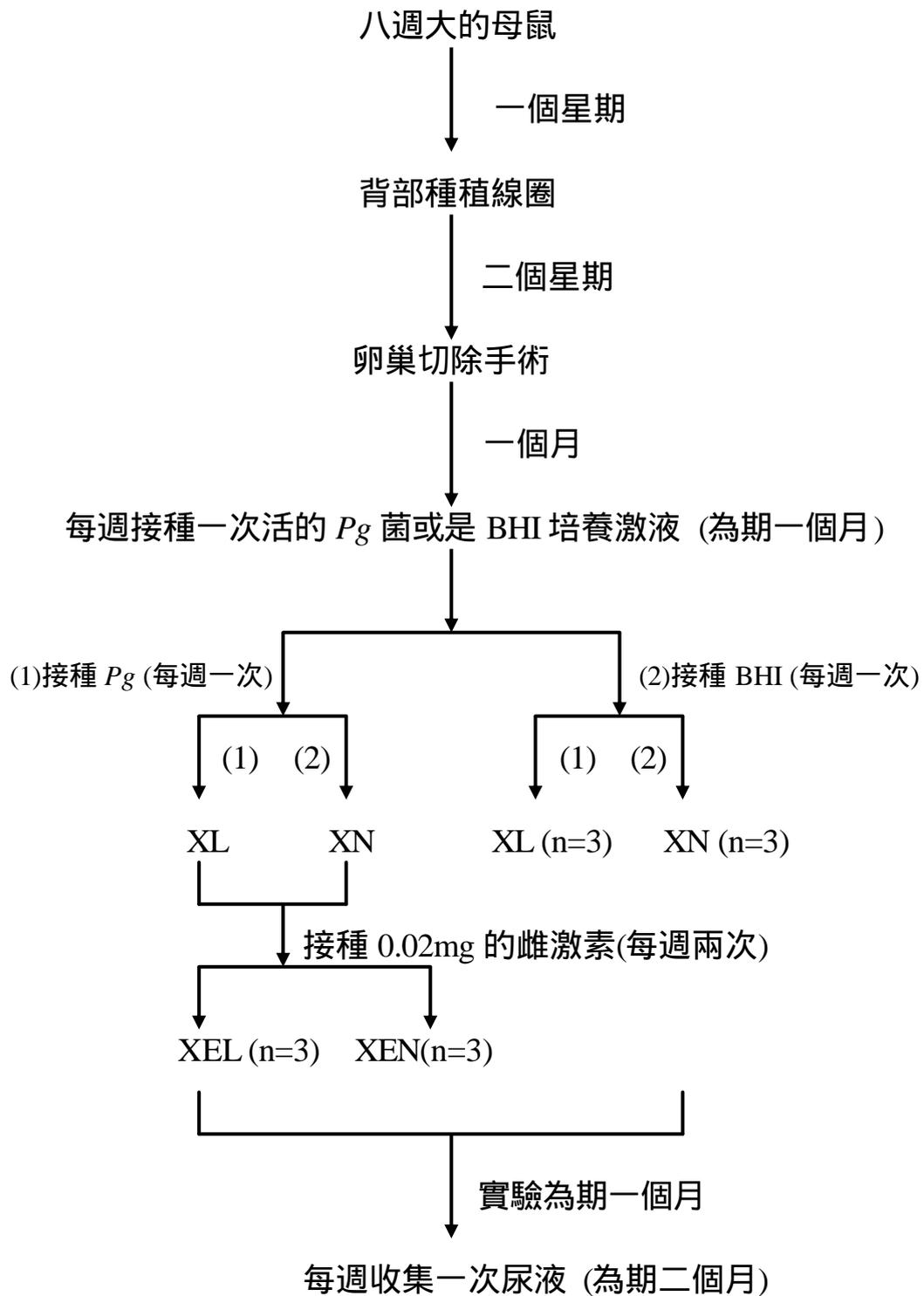


檢測分析如下：1. 檢測尿液中的鈣、磷、肌酸、鹼性磷酸酵素

2. 檢測尿液中的 DPD

3. 將老鼠犧牲之後灰化，分析其全身鈣的含量

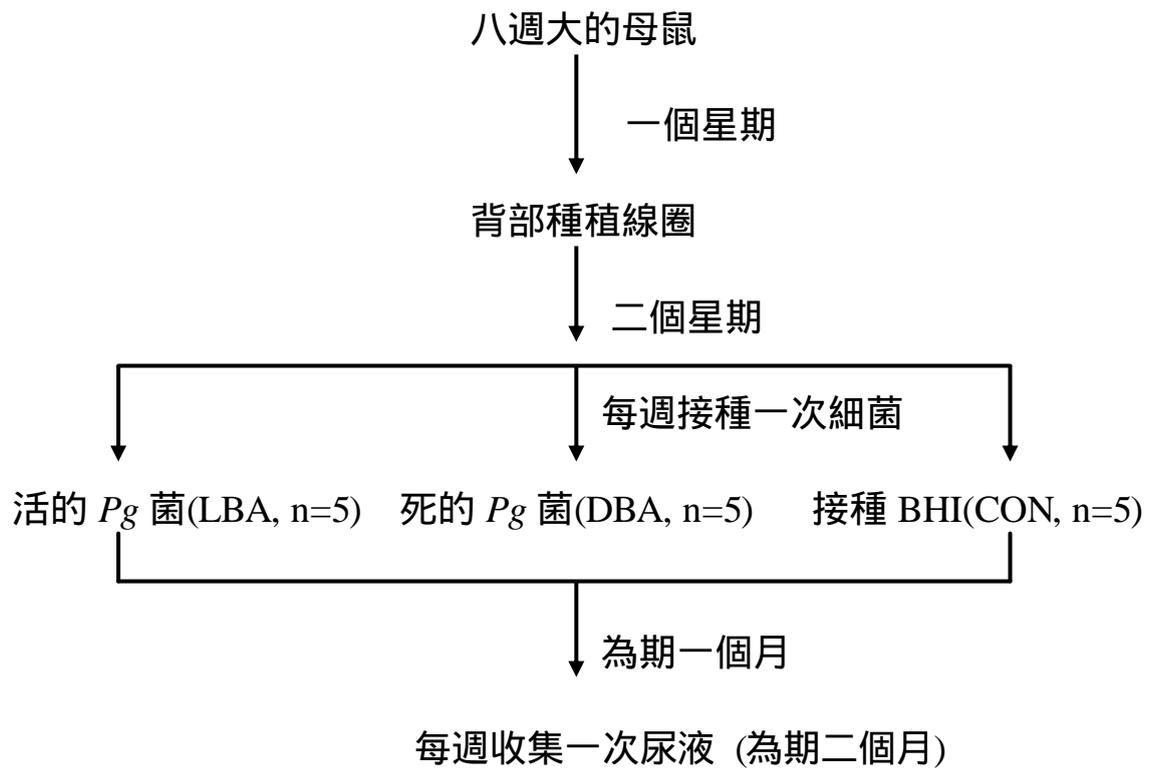
圖三：補充雌激素對於感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠其骨頭流失影響的實驗簡圖



檢測分析如下：

1. 檢測尿液中的鈣、磷、肌酸、鹼性磷酸酵素
2. 檢測尿液中的 DPD
3. 將老鼠犧牲之後灰化，分析其全身鈣的含量

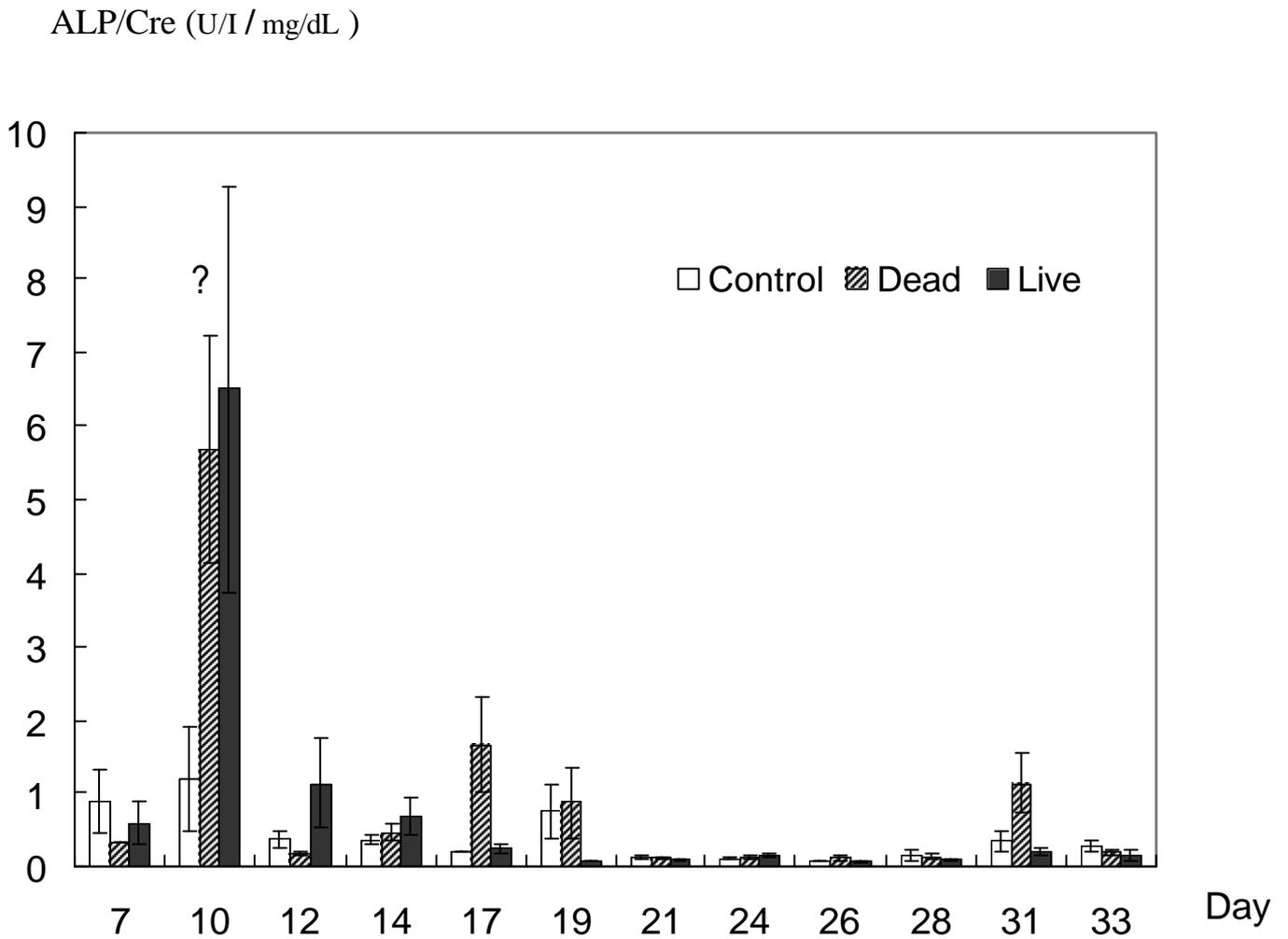
圖四：局部感染 *Pg* 菌對於正常老鼠全身骨頭影響的實驗簡圖



檢測分析如下：

1. 檢測尿液中的鈣、磷、肌酸、鹼性磷酸酵素
2. 檢測尿液中的 DPD
3. 將老鼠犧牲之後灰化，分析其全身鈣的含量。

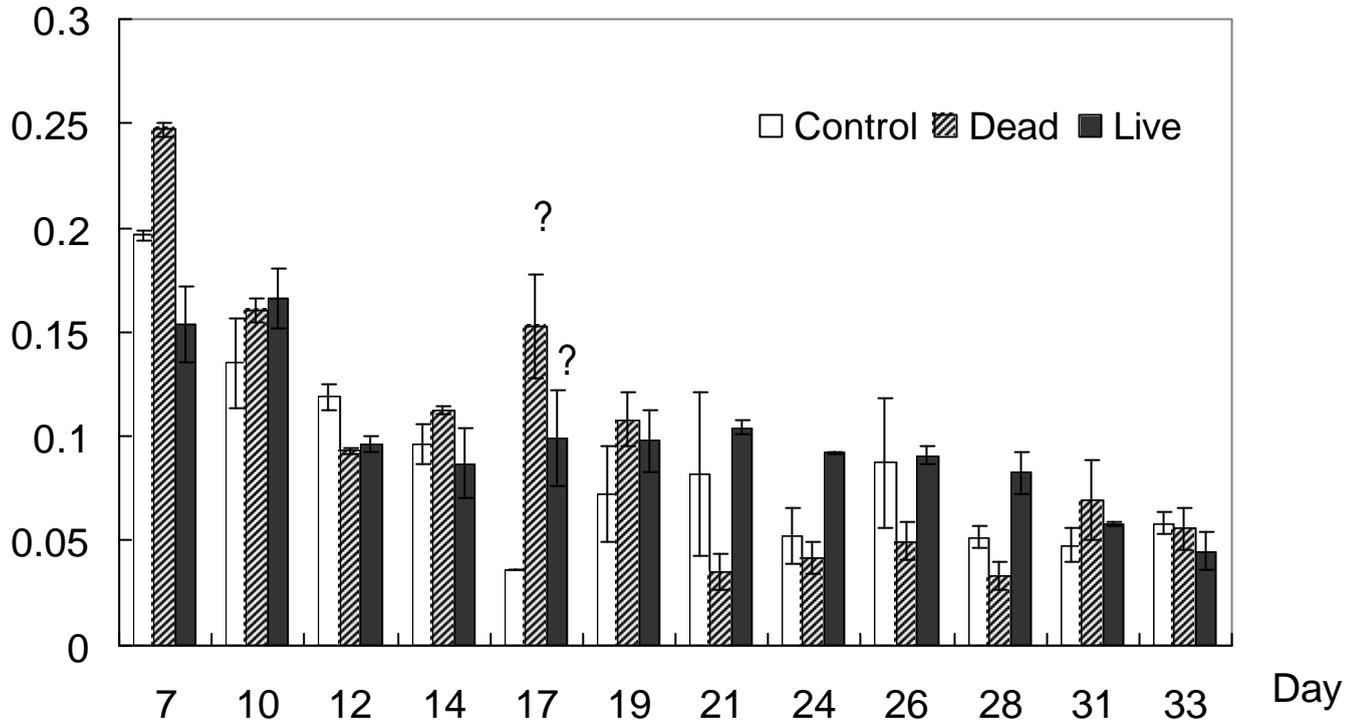
圖五：Pg 的感染對於卵巢切除老鼠尿液中鹼性磷酸酵素的影響



卵巢切除老鼠若感染 Pg 菌,其尿液中鹼性磷酸酵素在第 10 天相較於控制組其  $p=0.11$ , 但接種死菌的老鼠其尿液中的鹼性磷酸酵素則較控制組高  $p < 0.05$ , 但在其它時間點則沒有發現到差異性, 利用 student's *t*-test 分析, ?表 Dead 與 Control 有顯著差異,  $p < 0.05$ 。(Control: 接種 BHI 培養液的卵巢切除老鼠, Live: 接種活 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠, 而 Dead: 接種死 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠,  $n = 3$ )

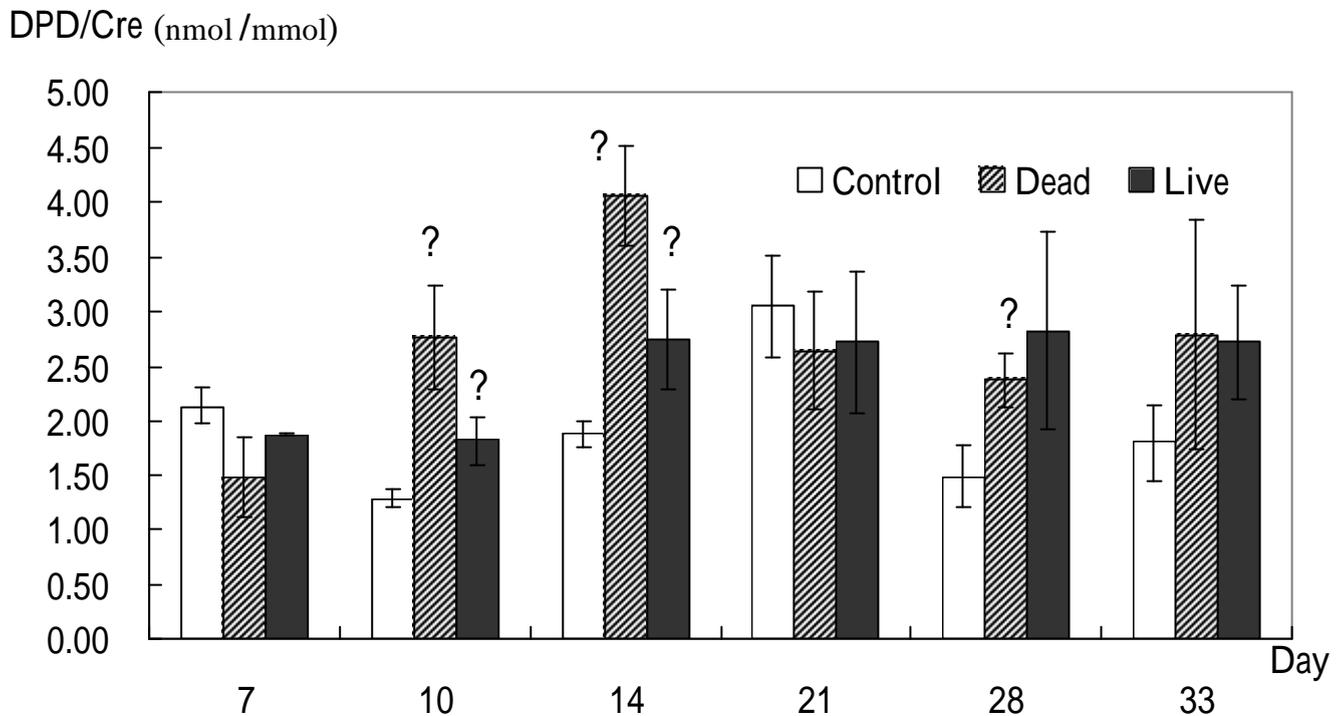
圖六：Pg 的感染對於卵巢切除老鼠尿液中鈣的影響

Ca/Cre (mg/dL / mg/dL)



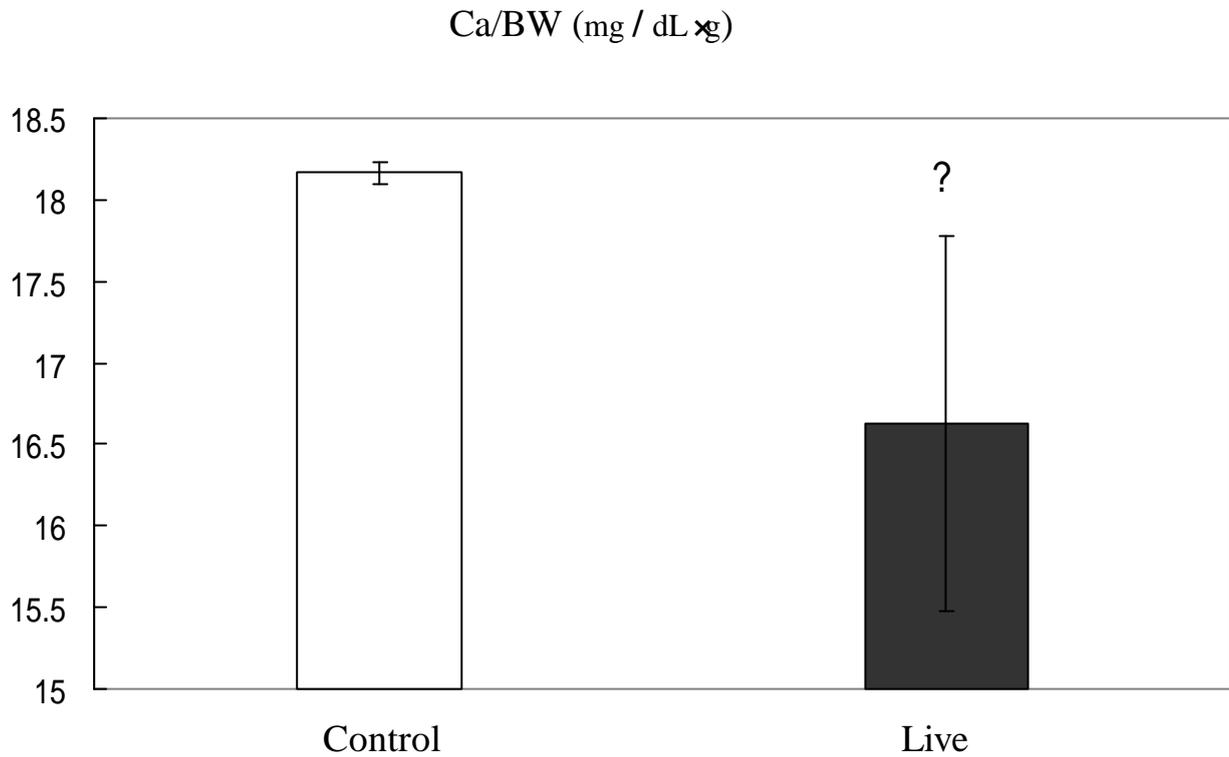
卵巢切除老鼠若感染 Pg 菌，其尿液中鈣的含量在第 17 天相較於控制組高，但在其它的時間點則沒有差異性，利用 student's *t*-test 分析，?表 Dead 與 Control 有顯著差異，?表 Live 與 Control 有顯著差異， $p < 0.05$ 。(Control：接種 BHI 培養液的卵巢切除老鼠，Live：接種活 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠，而 Dead：接種死 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠， $n = 3$ )

圖七：Pg 的感染對於卵巢切除老鼠尿液中 Deoxypyridinoline Crosslinks (DPD) 的影響



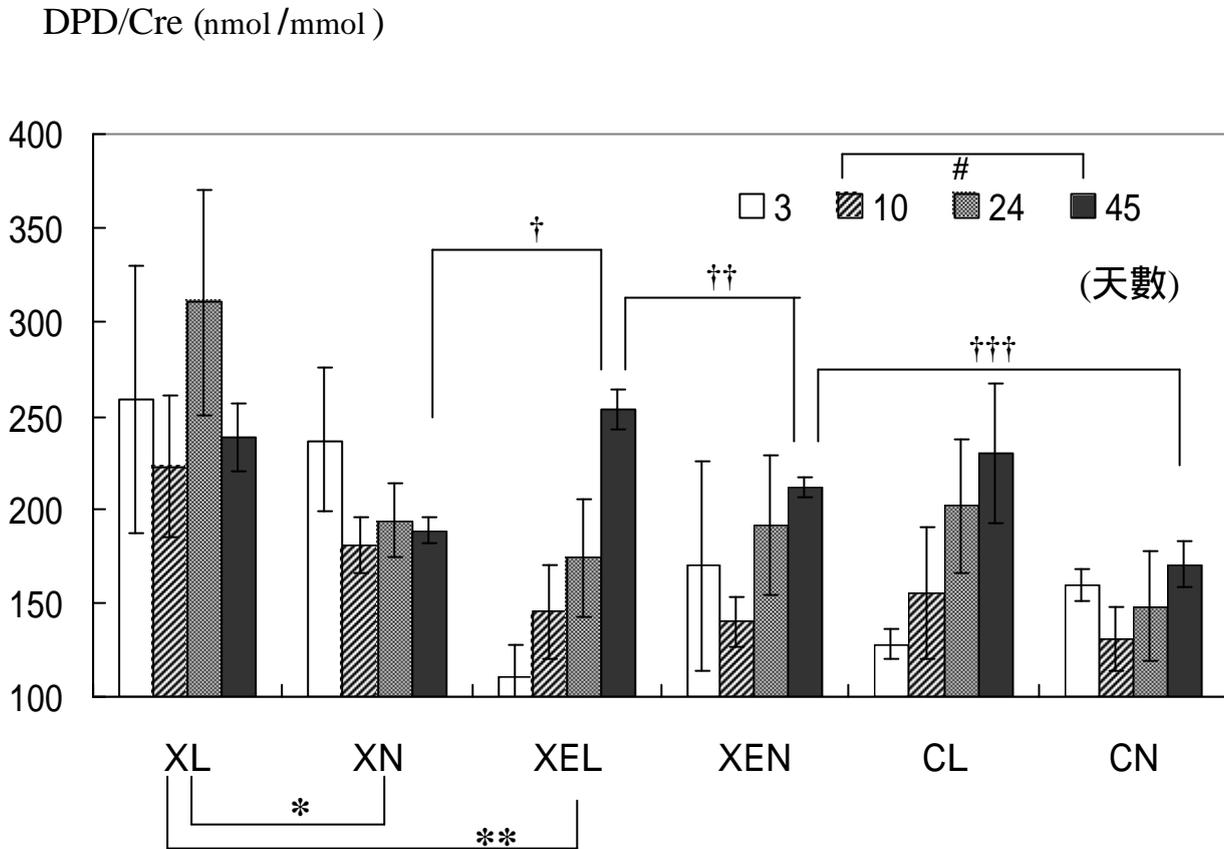
卵巢切除老鼠若感染 Pg 菌，其尿液中的 DPD 在第 10、14 以及 28 天都比控制組高，利用 student's *t*-test 分析，?表 Dead 與 Control 有顯著差異，? 表 Live 與 Control 有顯著差異， $p < 0.05$ 。(Control：接種 BHI 培養液的卵巢切除老鼠，Live：接種活 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠，而 Dead：接種死 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠， $n = 3$ )

圖八：Pg 的感染對於卵巢切除老鼠全身性鈣的影響



感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠，其全身性鈣的含量會較未感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠低，利用 student's *t*-test 分析，?表 Live 與 Control 有顯著差異， $p < 0.05$ 。(Control：接種 BHI 培養液的卵巢切除老鼠，Live：接種活 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠， $n = 3$ )

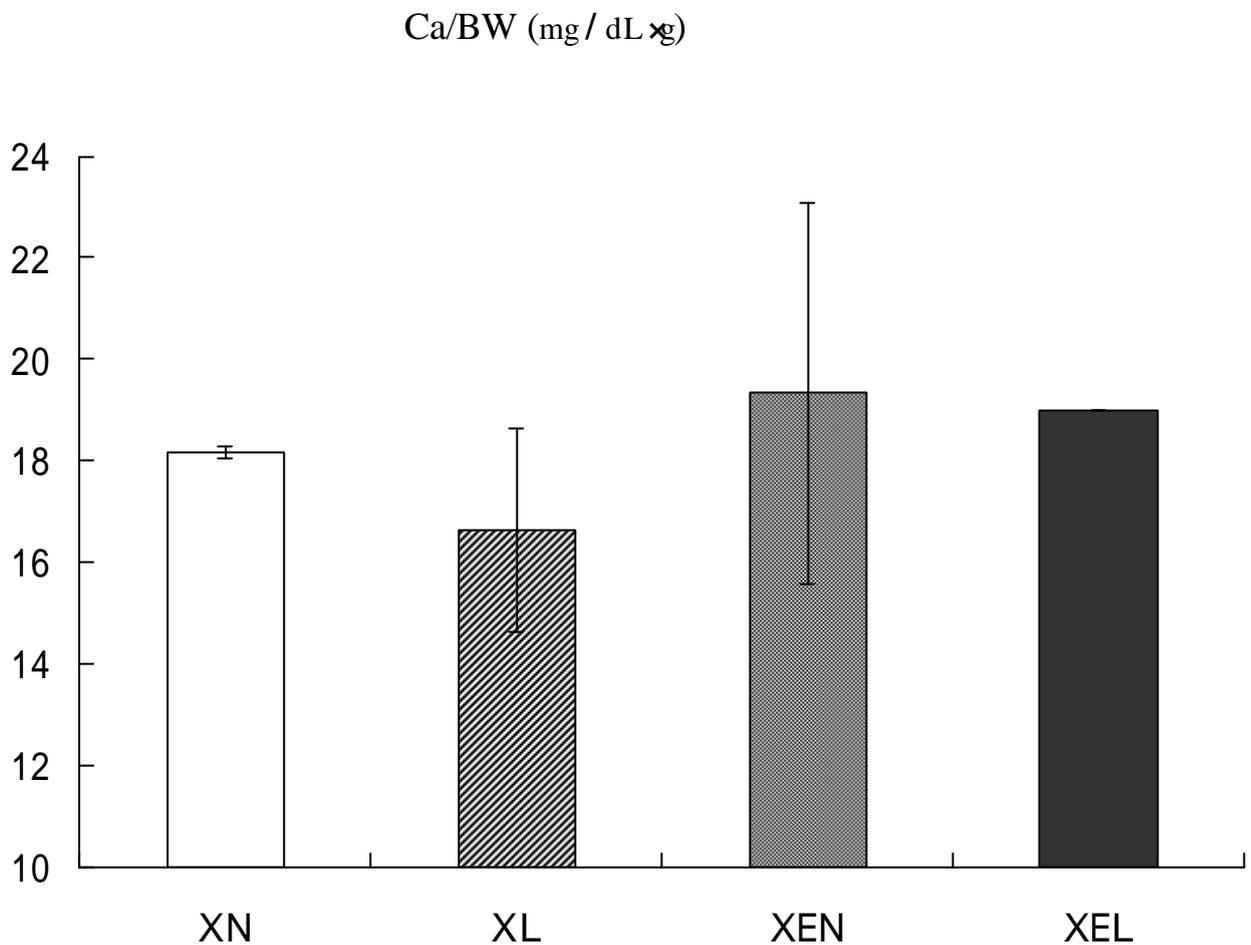
圖九：補充雌激素對於感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠其尿液中 DPD 的影響



感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠，當補充雌激素進入老鼠體內，其尿液中 DPD 的含量在第 45 天時，與未補充雌激素的卵巢切除老鼠有顯著差異，而同樣補充雌激素的卵巢切除老鼠，感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠其尿液中 DPD 的含量在第 45 天時，與未感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠有顯著的差異，另外補充雌激素且未感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠其尿液中 DPD 的含量，與未感染 *Pg* 菌的正常老鼠(未進行卵巢切除)有顯著的差異，然而利用 two-way ANOVA 分析有差異性之後，再利用 Student-Newman-Keuls Method 進一步分析組間是否有差異性，統計分析發現 XL 與 XEL(\*)以及 XL 與 XN(\*\*)之間有顯著的差

異， $p < 0.05$ ，而各組之間在第 45 天的 DPD 含量相較於第 10 天的 DPD 含量都有顯著的差異(#)， $p < 0.05$ 。(XL：感染活 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠，XN：接種 BHI 培養液的卵巢切除老鼠，XEL：感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠並補充雌激素，XEN：接種 BHI 培養液的卵巢切除老鼠並補充雌激素，CL：接種活 *Pg* 菌的正常老鼠，CN：接種 BHI 培養液的正常老鼠， $n = 3$ ；利用 Student's *t*-test 分析，†表 XEL 與 XN 在第 45 天時尿液中 DPD 有顯著的差異，††表 XEL 與 XEN 在第 45 天時尿液中 DPD 有顯著的差異，†††表 XEN 與 CN 在第 45 天時尿液中 DPD 有顯著的差異。)

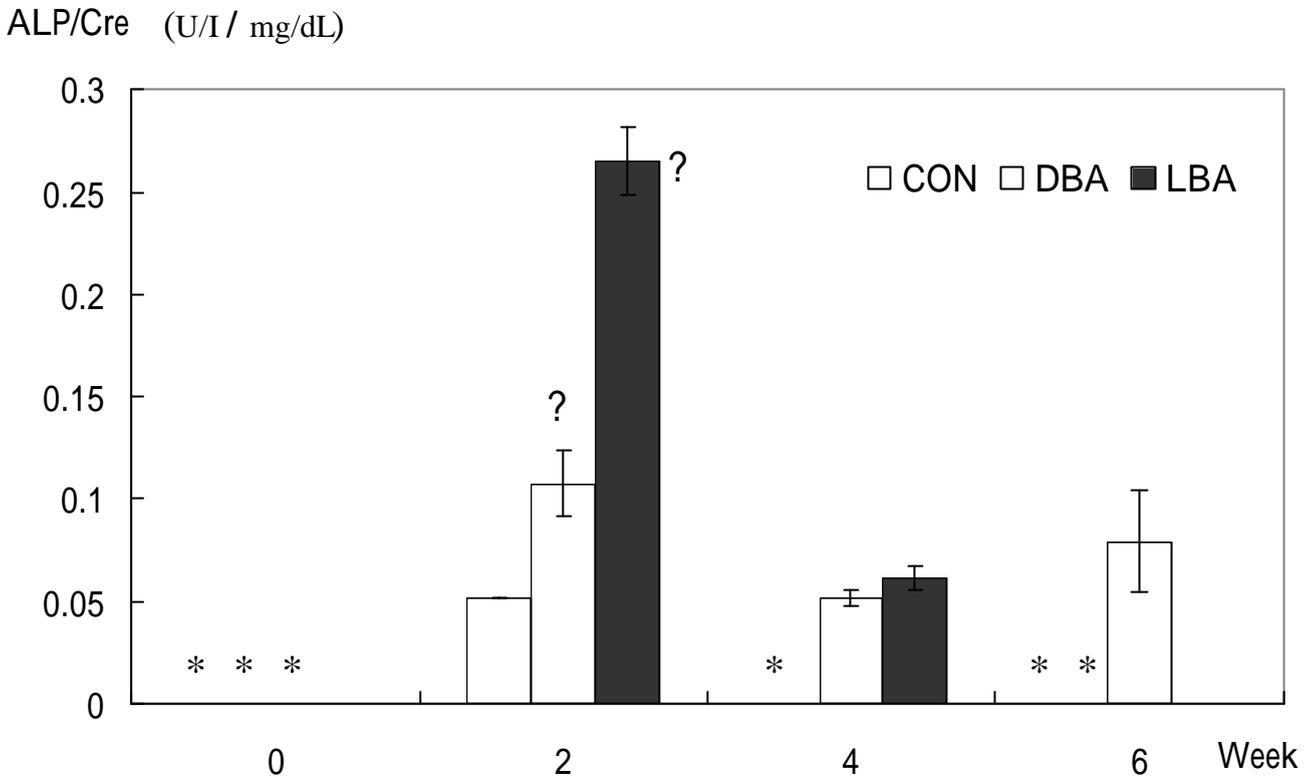
圖十：補充雌激素對於感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠其全身性鈣的影響



未感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠，當補充雌激素進入老鼠體內，其全身性鈣的含量會較未補充雌激素的卵巢切除老鼠高，同樣的當感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠補充雌激素進入老鼠體內，其全身性鈣的含量也較未補充雌激素且感染 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠高，但同時補充雌激素進入卵巢切除老鼠體內，則感染 *Pg* 菌與否對於全身性鈣的含量並沒有顯著的差異，利用 student's *t*-test 分析，XL 與 XN, XN 與 XEN, XL 與 XEL 以及

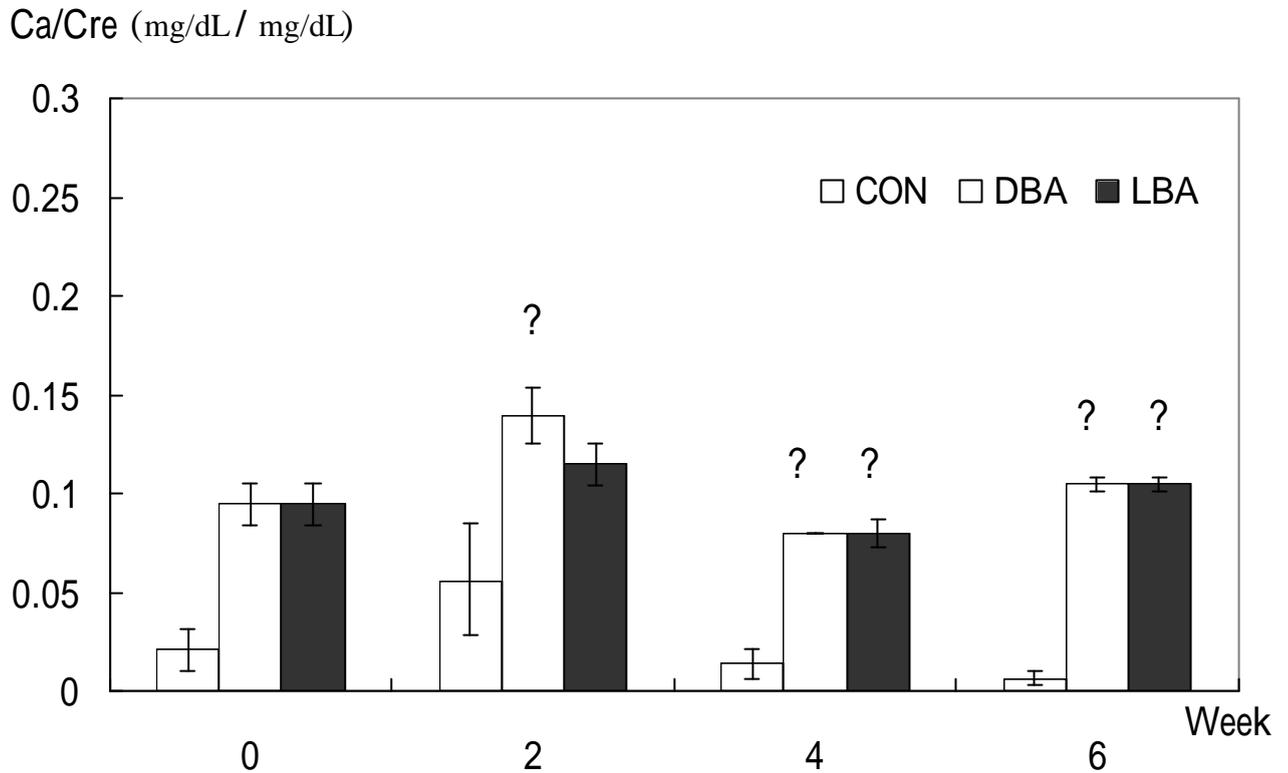
XEN 與 XEL 都沒有顯著的差異。(XL：感染活 *Pg* 菌的卵巢切除老鼠，  
XN：接種 BHI 培養液的卵巢切除老鼠，XEL：感染 *Pg* 菌的卵巢切除老  
鼠並補充雌激素，XEN：接種 BHI 培養液的卵巢切除老鼠並補充雌激  
素，n = 3)

圖十一：Pg 菌的感染對於正常老鼠其尿液中鹼性磷酸酵素的影響



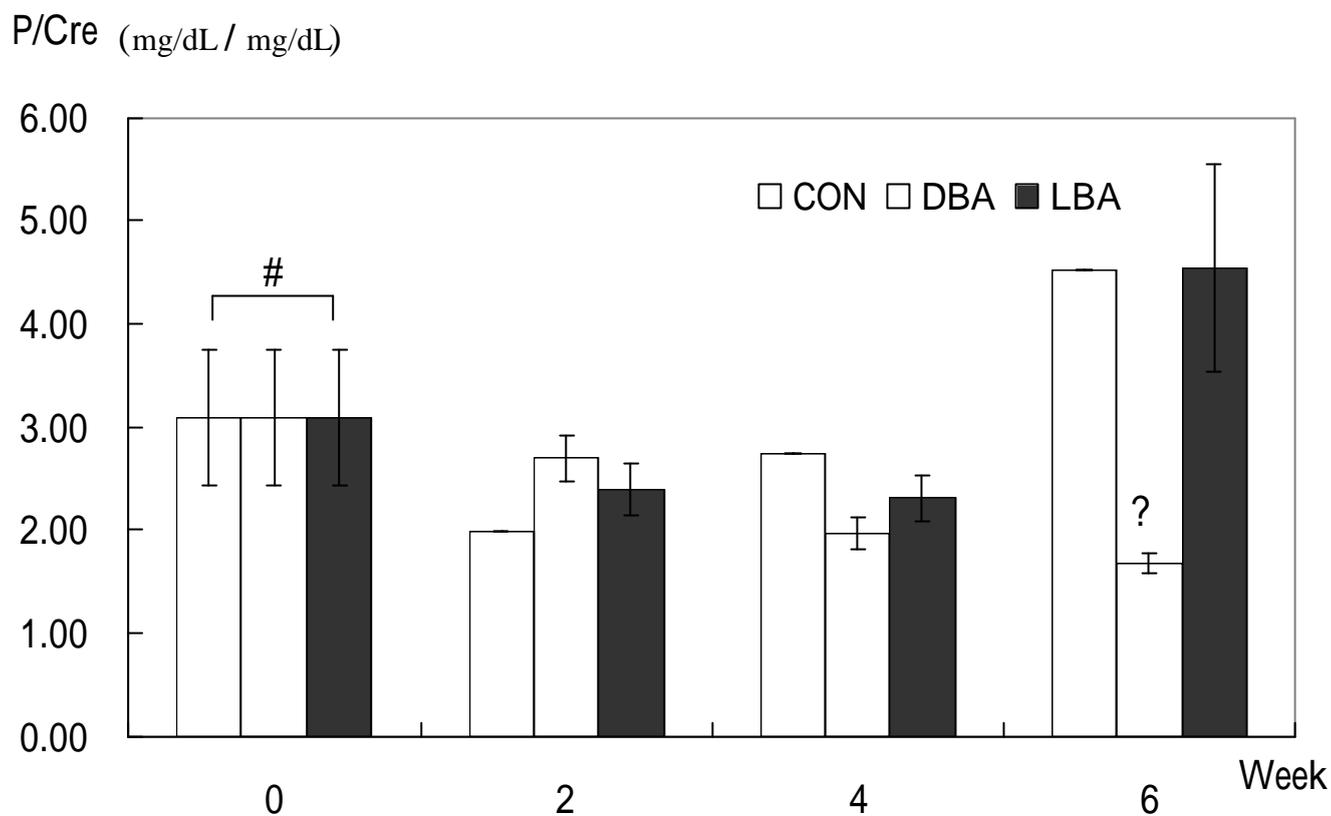
正常老鼠若感染 Pg 菌，其尿液中鹼性磷酸酵素在第 2 週相較於未感染 Pg 菌的正長老鼠高，但其它的時間點則沒有發現到差異，利用 student's *t*-test 分析，?表 DBA 與 CON 有顯著差異，? 表 LBA 與 CON 有顯著差異， $p < 0.05$ ，\*表低於可檢測的濃度。(CON：接種 BHI 培養液的正常老鼠，DBA：接種死 *Pg* 菌的正常老鼠，LBA：接種活 *Pg* 菌的正常老鼠， $n = 5$ )

圖十二：Pg 菌的感染對於正常老鼠其尿液中鈣的影響



正常老鼠若感染 Pg 菌，其尿液中鈣的含量在第 2、4 以及 6 週相較於未感染 Pg 菌的正常老鼠高(但第 2 週 LBA 與 CON 並沒有顯著差異  $p=0.1012$ ), 利用 student's *t*-test 分析, ? 表 DBA 與 CON 有顯著差異, ? 表 LBA 與 CON 有顯著差異,  $p < 0.05$ 。(CON: 接種 BHI 培養液的正常老鼠, DBA: 接種死 *Pg* 菌的正常老鼠, LBA: 接種活 *Pg* 菌的正常老鼠,  $n = 5$ )

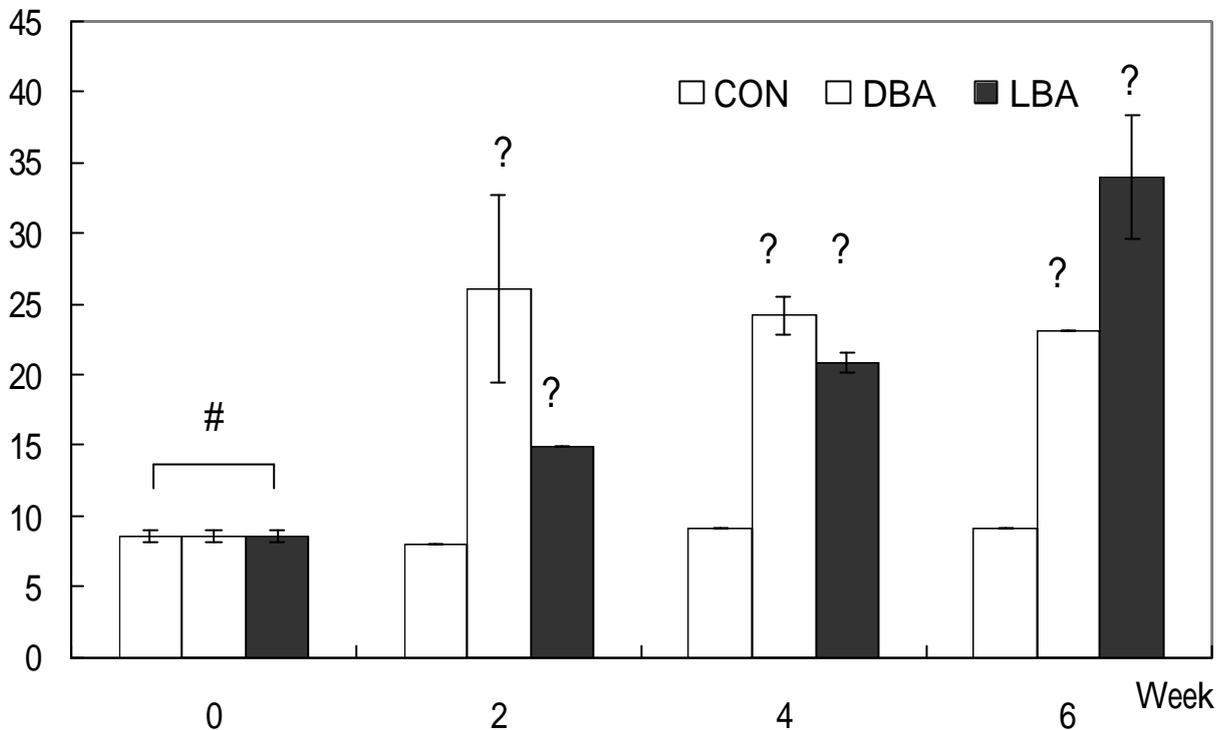
圖十三：Pg 菌的感染對於正常老鼠其尿液中磷的影響



正常老鼠若感染 Pg 菌，其尿液中磷的含量相較於未感染 Pg 菌的正常老鼠都沒有差異性，但在第 6 周時接種死 Pg 菌的老鼠其尿液中的磷則與控制組低，利用 student's *t*-test 分析，?表 DBA 與 CON 有顯著差異， $p < 0.05$ ，#表在第 0 週時 15 隻老鼠尿液磷的平均值，然後再將老鼠分為 CON, DBA 以及 LBA 三組。(CON: 接種 BHI 培養液的正常老鼠，DBA: 接種死 *Pg* 菌的正常老鼠，LBA: 接種活 *Pg* 菌的正常老鼠， $n = 5$ )

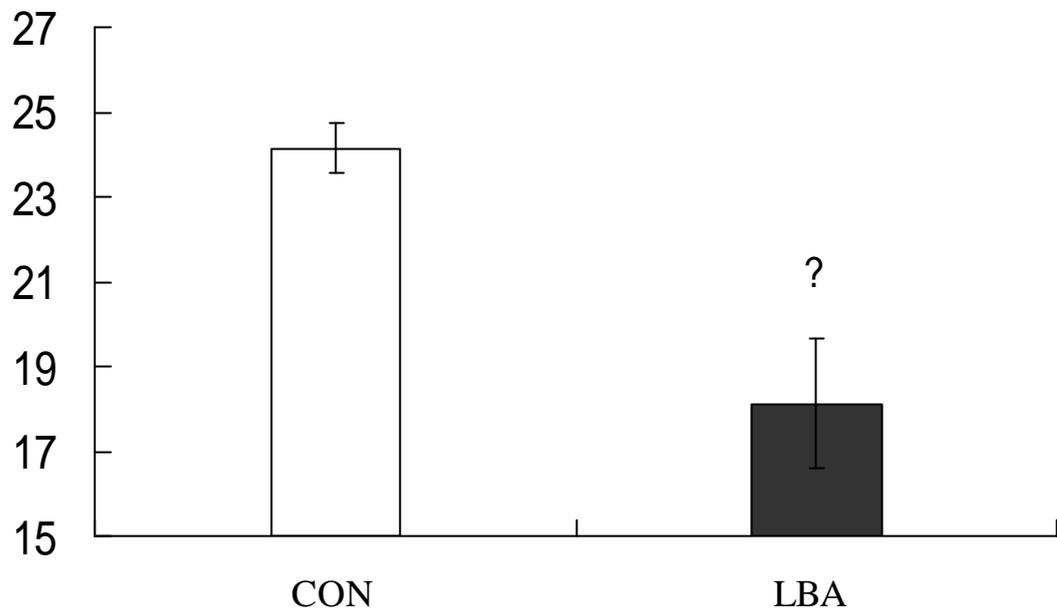
圖十四：Pg 菌的感染對於正常老鼠其尿液中 DPD 的影響

DPD/Cre (nmol / mmol)



正常老鼠若感染 Pg 菌，其尿中的 DPD 在第 2、4 以及 6 週相較於未感染 Pg 菌的正常老鼠高，利用 student's *t*-test 分析，? 表 DBA 與 CON 有顯著差異，? 表 LBA 與 CON 有顯著差異， $p < 0.05$ ，# 表在第 0 週時 15 隻老鼠尿液 DPD 的平均值，然後再將老鼠分為 CON, DBA 以及 LBA 三組。(CON：接種 BHI 培養液的正常老鼠，DBA：接種死 *Pg* 菌的正常老鼠，LBA：接種活 *Pg* 菌的正常老鼠， $n = 5$ )

圖十五：Pg 菌的感染對於正常老鼠其全身性鈣的影響



在正常老鼠中感染 Pg 菌時，其全身性鈣的含量會較未感染 Pg 菌的正常老鼠低，而且在統計上具有顯著差異，利用 student's *t*-test 分析，? 表 CON 與 LBA 有顯著差異， $p < 0.05$ 。(CON：接種 BHI 培養液的正常老鼠，LBA：接種活 *Pg* 菌的正常老鼠， $n = 5$ )