

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

桑椹萃取物及功能性成分在卵巢切除之大白鼠引起骨質疏鬆的延緩作用及機轉之研究

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 101-2320-B-040-009-
執行期間：101年08月01日至102年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：李慧禎
共同主持人：黃建寧
計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理人員：饒行佑

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 102 年 10 月 29 日

中文摘要： 停經是女性骨質疏鬆的主要成因，而骨質疏鬆除了雌激素影響之外，氧化壓力也是骨質疏鬆的重要機制。桑葚被發現具有很強的抗氧化力，因此，本研究以桑葚水萃取物餵予卵巢切除的大白鼠，以觀察其對骨質疏鬆的影響及相關機轉。結果顯示在卵巢切除的白鼠中 plasma alkaline phosphatase (ALP) 會顯著增加，而給予桑葚 8 周後可顯著降低 ALP。在大腿骨的切片染色中則發現股小樑密度減低及脂肪細胞變多，桑葚可改善此種骨質疏鬆的現象。在切除卵巢的大白鼠骨切片中，桑葚也此發現可以顯著增加 Heme oxygenase-1 (HO-1)，顯示桑葚具有改善骨骼中的氧化狀態。另外在組織中也發現桑葚可以增加成骨細胞的調節因子 Runx2 的表達，並減少蝕骨細胞調節因子 RANK/RANKL 的表達，但我們的結果中並無顯示桑葚具有植物雌激素的效用。由以上結果得知桑葚對卵巢切除後，雌激素缺乏狀態下的骨質疏鬆具有改善的效果，而這種結果可能來自於改善骨中的氧化狀態，進而調節成骨細胞分化及降低蝕骨細胞分化所致。本結果可對停經後骨質疏鬆的症狀提供一個預防策略，且對本土桑葚也增加另一種保健功效。

中文關鍵詞： 桑葚、骨質疏鬆、氧化壓力、成骨細胞、破骨細胞、凋謝死亡

英文摘要： Menopause is a major cause to induce osteoporosis in women. Osteoporosis is highly relative to oxidative stress. Mulberry was showed to possess good anti-oxidative ability. Here, mulberry water extract (MWE) was fed the ovariectomic rat to explore the potential mechanisms in osteoporosis. The results showed plasma alkaline phosphatase (ALP) increased significantly in ovariectomic rat. After MWEs given for 8 weeks, ALP was reduced. The ratio of adipocyte to osteoblast increased and trabecular bone density reduced dominantly in femur bone of ovariectomic rat, and MWE ameliorated the condition significantly. MWE also improved the anti-oxidation status due to increasing the expression of Heme oxygenase-1 (HO-1) in ovariectomic rat. The results showed MWE can increase the expression of Runx2 and decrease RANK/RANKL in ovariectomic rat; it revealed MWE might regulate the osteoblast differentiation and osteoclast proliferation. The present results point that MWE have the potential to decelerate the postmenopausal

women from osteoporosis.

英文關鍵詞： Mulberry, Osteoporosis, Oxidative stress, Osteoblast, Osteoclast, apoptosis

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

期中進度報告
 期末報告

桑椹萃取物及功能性成分在卵巢切除之大白鼠引起骨質疏
鬆的延緩作用及機轉之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 101-2320-B-040-009

執行期間：101 年 08 月 01 日至 102 年 07 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學醫學院醫學系生化科

計畫主持人：李慧禎

共同主持人：黃建寧

計畫參與人員：饒行佑

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 1 份：

移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

中 華 民 國 102 年 10 月 28 日

目錄

摘要.....	1
內容	
一、前言.....	5
二、研究目的.....	11
三、文獻探討.....	12
四、研究方法.....	14
五、結果與討論.....	16
圖與表.....	19

中文摘要

關鍵字：桑葚、骨質疏鬆、氧化壓力、成骨細胞、破骨細胞、凋謝死亡

停經是女性骨質疏鬆的主要成因，而骨質疏鬆除了雌激素影響之外，氧化壓力也是骨質疏鬆的重要機制。桑葚被發現具有很強的抗氧化力，因此，本研究以桑葚水萃取物餵予卵巢切除的大白鼠，以觀察其對骨質疏鬆的影響及相關機轉。結果顯示在卵巢切除的白鼠中 plasma alkaline phosphatase (ALP) 會顯著增加，而給予桑葚 8 周後可顯著降低 ALP。在大腿骨的切片染色中則發現股小樑密度減低及脂肪細胞變多，桑葚可改善此種骨質疏鬆的現象。在切除卵巢的大白鼠骨切片中，桑葚也北發現可以顯著增加 Heme oxygenase-1 (HO-1)，顯示桑葚具有改善骨骼中的氧化狀態。另外在組織中也發現桑葚可以增加成骨細胞的調節因子 Runx2 的表達，並減少蝕骨細胞調節因子 RANK/RANKL 的表達，但我們的結果中並無顯示桑葚具有植物雌激素的效用。由以上結果得知桑葚對卵巢切除後，雌激素缺乏狀態下的骨質疏鬆具有改善的效果，而這種結果可能來自於改善骨中的氧化狀態，進而調節成骨細胞分化及降低蝕骨細胞分化所致。本結果可對停經後骨質疏鬆的症狀提供一個預防策略，且對本土桑葚也增加另一種保健功效。

英文摘要

Keywords: Mulberry, Osteoporosis, Oxidative stress, Osteoblast, Osteoclast, apoptosis

Menopause is a major cause to induce osteoporosis in women. Osteoporosis is highly relative to oxidative stress. Mulberry was showed to possess good anti-oxidative ability. Here, mulberry water extract (MWE) was fed the ovariectomic rat to explore the potential mechanisms in osteoporosis. The results showed plasma alkaline phosphatase (ALP) increased significantly in ovariectomic rat. After MWEs given for 8 weeks, ALP was reduced. The ratio of adipocyte to osteoblast increased and trabecular bone density reduced dominantly in femur bone of ovariectomic rat, and MWE ameliorated the condition significantly. MWE also improved the anti-oxidation status due to increasing the expression of Heme oxygenase-1 (HO-1) in ovariectomic rat. The results showed MWE can increase the expression of Runx2 and decrease RANK/RANKL in ovariectomic rat; it revealed MWE might regulate the osteoblast differentiation and osteoclast proliferation. The present results point that MWE have the potential to decelerate the postmenopausal women from osteoporosis.

- 1) 骨內礦物質含量減少（主要是鈣），比例發生變化，骨的硬度降低。
- 2) 骨的微細結構發生了變化，它的微細結構主要指的是骨小梁發生斷裂，這也是骨質疏鬆疼痛的原因之一。
- 3) 骨的韌性降低，骨質疏鬆不僅是礦物質含量減少，骨的有機基質，也發生變化，影響了骨的彈性，而韌性降低。

骨質疏鬆常見的部位主要有：(1) 脊椎骨：一旦骨質疏鬆的程度使得脊椎骨無法再負擔全身的重量，脊椎骨就會像海綿一樣被壓扁，稱之為「壓迫性骨折」。通常會有身高變矮；(2) 股骨（大腿骨）頭部及手腕骨：常在跌倒發生骨折。

人類巔峰骨骼質量(peak bone mass)通常在 30 到 40 歲間就會達到，隨後便會走下坡，漸漸發生礦物質流失(demineralization)現象。一般來說，女性骨質流失最快的時期是停經後五年間，脊椎密度平均每年減少 3-6%，而超過 50% 年過 80 歲的女性會有骨折的經歷。男性骨質流失的速率則較為穩定，在達平均巔峰骨骼質量後，依據不同部位，每年流失約 0.5-2%。依行政院衛生署統計，台灣 70 歲以上老年人口有 8 成 6 出現骨質流失或骨質疏鬆現象，但 50 歲以下民眾也有近 4 成骨質開始流失或疏鬆。值得注意的是，該年齡層男性 19% 已有骨質疏鬆，比例較女性的 6% 高出 3 倍多。隨著人口高齡化，台灣 65 歲以上人口約有 50 萬人罹患骨質疏鬆症，每年更有 6 萬人因骨質疏鬆而造成脊椎骨折，世界衛生組織警告，骨質疏鬆已成為僅次於心血管疾病的第二大慢性疾病。

骨質疏鬆症之分類：

1) 原發性骨質疏鬆症：

佔百分之九十，屬退化性骨質疏鬆症，又可分為 Type I—由於停經後所引起，稱之為停經後骨質疏鬆症 (post-menopausal osteoporosis)；與 Type II—由於年紀老邁引起，稱之為老年型骨質疏鬆症。至於 type I 及 type II 在骨骼型態上的差異，2011 年 Khosla 等人回顧近年文獻發現在 estrogen 缺乏下所引起的骨質疏鬆主要出現疏鬆的位置在骨骼之最外層皮質骨 (cortical bone)，因為此處的骨細胞內的雌激素接受器主要為 E_R α ，所以在停經期的雌激素減少時對皮質骨的影響較顯著；而骨小樑 (trabecular bone) 的骨質疏鬆則可能除 estrogen 的影響外，老化或 androgen 缺乏也可能引起 trabecular bone 變細或疏鬆。(Khosla et al., 2011)

2) 續發性骨質疏鬆症：

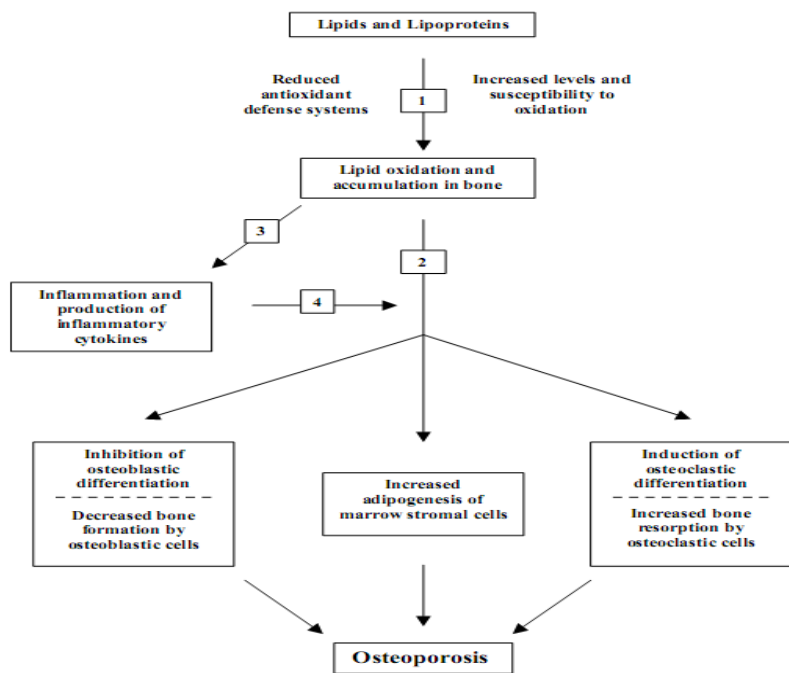
亦稱 Type III，佔百分之十，為由於某種原因造成，如內分泌疾病（包括副甲狀腺，甲狀腺，性腺，以及腎上腺等功能異常）、營養不良、血液疾病、藥物以及其他疾病等等原因引起之骨質疏鬆症。

2. Oxidative stress 及 Osteoporosis

Osteoblast 及 adipocyte 皆源於 mesenchymal stem cell，osteoblast 的分化會透過 Runx2 (core-binding factor 1, Cbfa1) 這個轉錄因子與 osteoblast-specific cis-acting element 2 (OSE2) 啟動區結合，而 OSE2 在許多主要的 osteoblast-specific gene 都有發現 (e.g., osteocalcin, type I collagen, and alkaline phosphatase)。另外，osteoblast 的分化可能會透過 bone morphogenetic protein (BMP)-Smad signaling, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), phosphatidylinositol 3 kinase (PI-3K) 等路徑去調控 osteoblastic 的分化。在先前的研究指出，氧化的脂質在骨質疏鬆症中扮演重要的角色，當身體內有大量的氧化脂質或過氧化產物，會抑制 osteoblast 的分化，進而影響骨髓內造骨細胞與脂肪細胞的比例，形成骨質疏鬆 (Parhami, 2003)。抑制 osteoblast 分化的分子包括 minimally oxidized LDL (MM-LDL), isoprostane 8-isoprostaglandin E₂ (isoPGE₂), 及 oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphoryl choline (Ox-PAPC)(如附圖二)。Osteoclast 主要是 hematopoietic granulocyte-macrophage CFU (CFU-GM) 分化而來，CFU-GM 也會分

化會成單核球及巨噬細胞，osteoclast的分化會受到RANK signaling及一些發炎因子調節(e.g., interleukin-1,interleukin-3, interleukin-6, interleukin-11, tumor necrosis factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor, leukemia inhibitory factor, and stem-cell factor)。當女性處於停經或estrogen缺乏時，體內的Reactive oxygen species (ROS)會大量的產生，而ROS會透過Erk、NF-κB這條路徑抑制osteoblast的增生，並增加osteoblast的apoptosis。而在osteoclast的方面，ROS會透過活化Erk、NF-κB這條路徑，使osteoclast的分化增加，而抑制了osteoclast的apoptosis。除此之外，ROS也增加了氧化態脂質，對osteoblast differentiation也更造成抑制的作用，增加停經後骨質疏鬆的機率。

<附圖二>



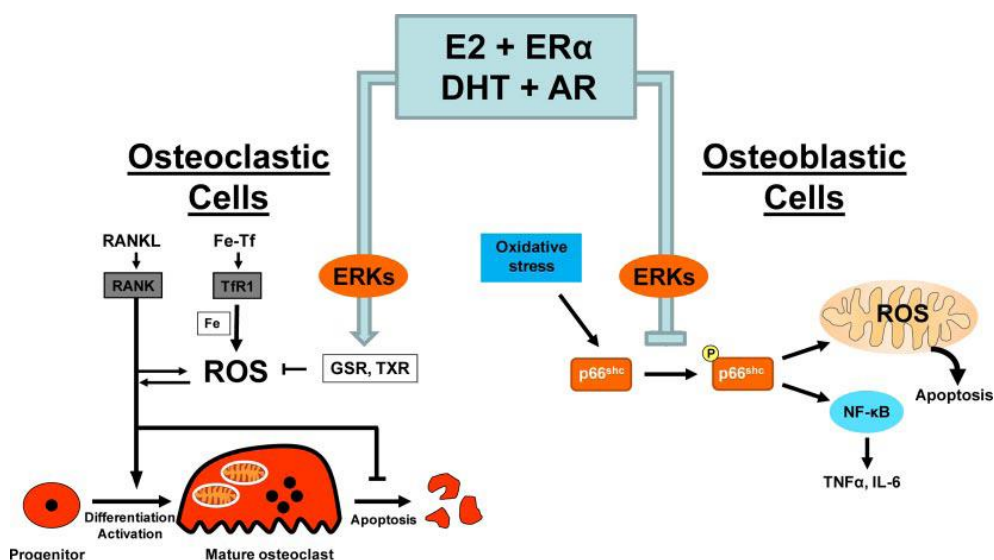
from Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 2003, 68, 373–378

3. 雌激素與骨質疏鬆

在先前的文獻指出，體內的estrogen具有抗氧化的功能，並可以降低停經後婦女發生心臟疾病的機率。近年來的流行病學研究更指出，estrogen具有降低缺血性心臟病(ischemic heart disease)的發生率，而在許多的動物實驗中也發現，estrogen具有抑制冠狀動脈粥樣硬化(arteriosclerotic lesions)的形成，且也具有影響脂質代謝的功能，並直接的影響到血管細胞，包括了內皮細胞、血管平滑肌細胞，而在研究中發現，在內皮細胞及血管平滑肌細胞的細胞膜上都有estrogen receptor的存在，這發現也證實這些細胞可以與estrogen結合，進而影響其分子機轉。而在骨骼形成及其重塑作用的調節上，先前研究指出estrogen及androgen皆可在與他們的receptor結合後直接經由hormone response element調節基因表達，或是receptor與轉錄因子以protein/protein interaction的方式調節基因。此外，estrogen及其receptor結合後，也可經由細胞質中的激酶如ERK影響轉錄因子活性以調節osteoblast及osteoclast的細胞凋亡以調節骨骼結構(Kousteni et al., 2001; Kousteni et al., 2003; Chen et al., 2005)。

對osteoblast而言，在oxidative stress的狀態下，p66shc的磷酸化會使粒線體中ROS增加而導致細胞死亡。Estrogen在此種情形下會減少ROS生成、刺激GSR活性及降低p66shc磷酸化以保護osteoblast免於死亡(Almeida et al., 2009)；另外，在in vitro系統中加入如H₂O₂、etoposide引起的osteoblast apoptosis，estrogen可經由調節Src及MAPK kinase kinases而延緩此種現象(Almeida., 2007)。(如附圖三)

<附圖三>



from Endocrine Reviews, 2010, 31:266–300

而osteoclast，它是一種acid-secreting polykaryons，對能量需求高，因此含有豐富粒線體。先前文獻指出不論在in vitro或in vivo，適量增加ROS或去除抗氧化分子GSH會使ERK及 NF-κB 活化而刺激 receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) 及 TNFα expression，對osteoclast differentiation具促進作用 (Garrett et al., 1990; Levasseur et al., 2003; Bai et al., 2005; Lean et al., 2005)，Estrogen在此狀況下會經由它的抗氧化作用減低osteoclast以防止骨質流失。2007年, Nakamura等人 (Nakamura et al., 2007) 在去除ERα的雌鼠中也發現estrogen可能經由增加 Fas ligand產量而使osteoclast 進行apoptosis。這些結果指出estrogen在調節osteoblast及osteoclast的作用會減低osteoporosis。

4. 目前臨床上對osteoporosis的治療方法

- 1) **鈣質與充足之營養：** 補充鈣質在停經後的婦女並不能完全停止骨質的流失，但是可以部分緩解骨質的逐漸流失。目前鈣的推薦攝取量在白人為：青少年以及年輕人每日1200-1500mg，停經後婦女每天建議攝取量1000 - 1500mg。隨不同種族、不同之蛋白質攝取量及不同之體型骨架，鈣需要量而有所差異。另外，一些重要的微量營養因子如 strontium、magnesium、potassium及 vitamin K 也都被指出對骨骼有益 (Genuis et al., 2007；New et al., 2000)
- 2) **雌性激素：** 雌性激素應用於防止停經後婦女的骨質流失在臨床是為首選藥物。最佳療效劑量為每日 0.625 mg 的雌性激素 (Conjugated equine estrogen) 或 1-2 mg 的二氫基雌性激素 (17β-estradiol) 或其他同效量之口服活性雌性激素。若是合併鈣質的補充，則低劑量的雌性激素 (Conjugated equine estrogen) (0.3mg/day) 就可以達到防止骨質流失的效果。但雌性激素可能導致子宮內膜癌的危險。天然的植物雌激素也被發現具有降低骨質疏鬆的功效。2010年, Hassan 等人以脫脂大豆及粉碎大豆飼食切除卵巢的大白鼠，結果發現骨質疏鬆現象及指標皆有改善 (Hassan et al., 2010)；2011年, Shuid 等人以一種含植物雌激素的植物萃物 Labisia pumila var. alata 給予切除卵巢的大白鼠，發現天然植物雌激素的補充可以預防骨質疏鬆 (Shuid et al., 2011)
- 3) **抑鈣素 (calcitonin)：** 抑鈣素在蝕骨細胞尚有其受體，可以抑制骨頭的再吸收作用，最主要是能夠避免脊椎骨的骨質流失，但是其他地方的骨質仍會流失。有少許的證據顯示可減少骨折之發生。抑鈣素已被 FDA 同意作為治療停經後骨質疏鬆症的藥物，可使用注射 (皮下或肌肉) 或鼻噴霧劑之方式給藥。臨床上亦應同時補充鈣以及維他命 D 以避免副甲狀腺素之升高。抑鈣素同時有止痛效

果，可以部分解除骨質疏鬆病人因骨折或脊椎變形引起的慢性背痛。

- 4) **雙磷酸鹽類 (biphosphonates)**: 能對骨骼之再吸收作用產生極強之抑制作用，是一種治療骨質疏鬆症的重要方法。臨床上已被證實能抑制停經後婦女及使用類固醇引起之骨質疏鬆症之骨骼流失作用。唯其對減低骨折之發生尚無定論，並且在劑量過高時還會抑制骨頭的礦化作用或引起下頷骨壞死。
- 5) **活性維他命D及其類似物**: 老人由於飲食減少，少曬太陽，故活性維他命D較易缺乏，較易發生骨折。應每日補充400至800單位的維他命D或0.25 µg至0.75 µg之 1,25(OH)₂Vitamin D₃或其類似物 (Brown et al., 2002)。但應定期追蹤血鈣以防高血鈣症之發生。

5. 抗氧化劑在骨質疏鬆症的應用

近來文獻指出已有天然抗氧化劑應用於延緩或預防停經期骨質疏鬆的相關研究。2011年，Mackinnon等人針對停經女性給予 lycopene，結果發現增加血液中的抗氧化能力外，也減少 bone resorption marker N-telopeptide 的量，顯示 lycopene 具降低骨質疏鬆風險的能力 (Mackinnon et al., 2011)。2010年，Ruiz-Ramos 等人發現給予老年人 (平均 68.8 歲) 每天 1,000 mg 的 ascorbic acid (維生素 C) 及 400 IU 的 alpha-tocopherol (維生素 E)，連續 12 個月後，在股骨發現除了脂質過氧化產物顯著下降外，bone mineral density (BMD) 的下降也可被有效控制 (Ruiz-Ramos et al., 2010)。Nazrun 等人亦將維生素 E 的兩種型式 tocopherol 及 tocotrienol 在動物模式的骨質疏鬆進行效用的比較，結果發現兩者皆可有意義的對骨質疏鬆具保護作用 (Nanzun et al., 2010)。

6. 桑椹

桑椹 (mulberry) 是一種天然植物桑科落葉喬木“桑” (Morus alba L.) 的果實，其科、屬、種名為 MORACEAE Morus spp.。桑椹嫩時色清、味酸；成熟時紫黑、多汁。桑椹味甘酸、性涼，具滋陰養血、生津止渴、潤腸通便等作用，自古即被用來防治頭暈、目眩、盜汗、消渴、腸燥、便秘等現象，許多古籍記載了桑椹的藥用價值，但是在科學研究上卻缺乏科學證據來證實。近期研究發現桑椹可在細胞模式中抑制脂質生成並增加肝細胞中脂質清除率 (Ou et al., 2011)，在動物模式中也發現桑椹可有效減低肥胖 (Peng et al., 2011)；另外，桑椹亦被發現可以抑制胃癌細胞的生長 (Huang et al., 2011)。而由桑椹果實顏色為深度的紫紅顏色，顯示出桑椹具有豐富的色素成分，而許多的色素成分被證實是一種很好的抗氧化物質。由 Toscano 和 Lamonica 鑑定出桑椹的色素成分為花色苷 (anthocyanin)，而桑椹的花色苷為 cyanidin 3-glucoside 及 cyanidin 3-rutinoside，另外在我們研究室先前研究也發現桑椹亦含有 pelargonidin 3-glucoside 及 pelargonidin 3-rutinoside (如下表)。花青素廣泛存在於許多食用的植物果實中，不同的花青素具有不同的顏色，其中包含了：藍色、紫色或紅色等，在植物的果實中通常含有許多不同種類的花青素，並使其具有各種不同的色澤，如：草莓、葡萄及櫻桃等。一些具有醣基的醣化 delphinidin 與 cyanidin 也發現存在許多的植物中。在營養食品中添加入花青素萃取物，可以有效的使人們攝取到數個毫克的花青素。根據統計，在美國每人每天會攝取 180-250 毫克的花青素。現今，由天然植物果實中所萃取出具有高度花青素含量產物也廣泛的被接受。對於花青素的應用方面，被認為對於許多的疾病是具有有效的預防作用，此外也具有抗發炎及化學預防作用的功效。已有許多報告指出花青素具有抗氧化活性、抗致突變性，抗癌作用及降低脂質過氧化作用和 DNA 損傷。此外桑椹含有豐富的 flavonoides (如 quercetin、gossypetin、hibiscetin) 及原兒茶酸 (protocatechuic acid)，這些成份都具有抗氧化、防癌、抑制心血管病變。

Table 2-- Retention time, UV-vis, and mass spectral characteristics for the anthocyanic compositions of MWEs and MACs.

Peak ^a	Compound	Rt ^b (min)	λ (nm)	[M+H] ⁺ ^c	MS ² ^d
1	cyanidine-3-glucoside	24.9	514, 279, 245, 327	449	287
2	cyanidine-3-rutinoside	25.8	516, 280, 245, 327	595	449, 287
3	pelargonidin-3-glucoside	26.9	497, 270, 430 sh	433	271
4	pelargonidin-3-rutinoside	27.7	505, 279, 432 sh	579	271, 433

^aPeak numbering as in Figure 1.

^bRt = retention time.

^c[M+H]⁺ = positively charged molecular ion.

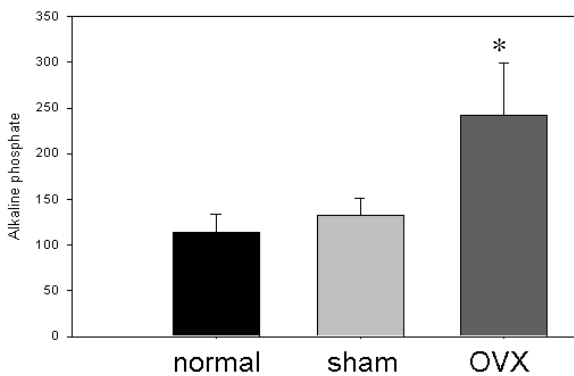
^dProduct ion analysis of molecular ion.

二、研究目的

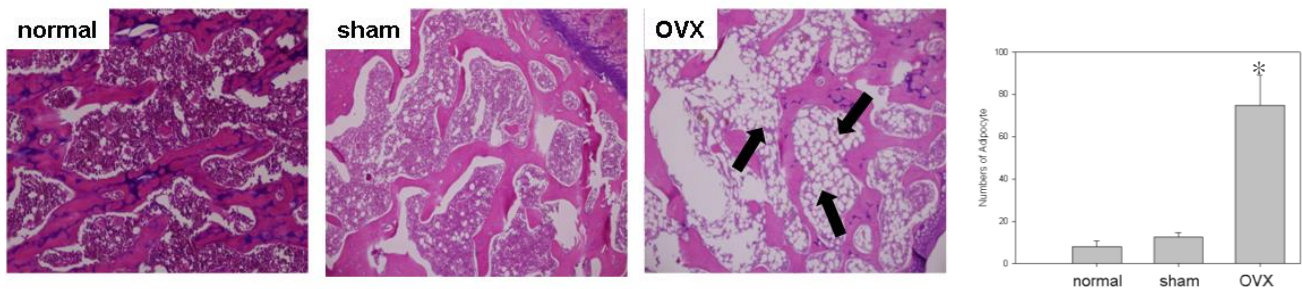
在先前的研究中發現，停經後的婦女在失去 estrogen 的保護之下，會有骨質疏鬆的現象產生，而在其他的文獻指出，骨質疏鬆的形成與體內產生的氧化壓力的多寡具有相關性。在我們預作的實驗中，發現去除卵巢大白鼠的：(1) 血漿中 alkaline phosphatase 有增加的現象 (圖一)；(2) 股骨有明顯骨小樑變薄及變疏的骨質疏鬆現象並發現脂肪細胞堆積 (圖二)；(3) 骨組織的免疫染色中初步發現 Runx2 蛋白減少 (圖三)。在桑椹的成分中，尚未有研究顯示桑椹具有 phytoestrogen，但眾多文獻顯示桑椹的良好抗氧化特性。先前的引述中已經看到去除卵巢會增加體內 ROS 而引起骨骼的成骨細胞死亡、蝕骨細胞分化而趨向骨質疏鬆，因此我們推測桑椹應能有效清除卵巢切除後所增加的 ROS，另外可能因此而調節 osteoblast 及 osteoclast 分化，以減少 osteoporosis。

本研究目的係以雌性大白鼠切除卵巢引起 osteoporosis 之動物模式，來探討桑椹水萃物之抗氧化能力對改善 osteoporosis 之影響及其機制探討。

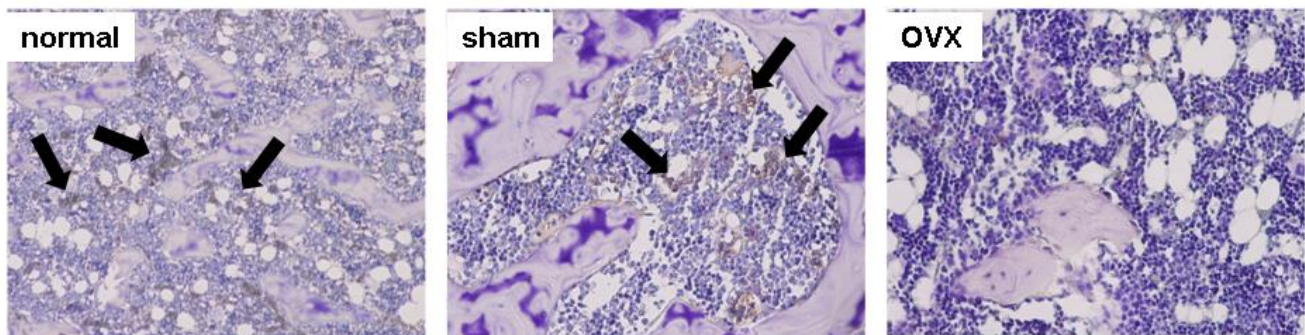
圖一：在卵巢切除後，大白鼠血漿中 alkaline phosphate 增加



圖二：在卵巢切除後，大白鼠股骨內骨小樑變細、斷裂變多及脂肪細胞增加 (骨小樑為圖中紅色區域；箭頭所指為脂肪細胞，量化圖在最右側)



圖三：在卵巢切除後，大白鼠骨骼中 Runx2 蛋白表達減少 (箭頭所指棕色區為 Runx2 positive)



三、文獻探討

壹、關於具抗氧化性天然萃物或抗氧化劑減緩骨質疏鬆之研究

1. 2011 年，Mackinnon 等人針對停經女性給予 lycopene，結果發現增加血液中的抗氧化能力外，也減少 bone resorption marker N-telopeptide 的量，顯示 lycopene 具降低骨質疏鬆風險的能力 (Mackinnon et al., 2011)。
2. 2010 年，Ruiz-Ramos 等人發現給予老年人 (平均 68.8 歲) 每天 1,000 mg 的 ascorbic acid (維生素 C) 及 400 IU 的 alpha-tocopherol (維生素 E)，連續 12 個月後，在股骨發現除了脂質過氧化產物顯著下降外，bone mineral density (BMD) 的下降也可被有效控制 (Ruiz-Ramos et al., 2010)。
3. Nazrun 等人亦將維生素 E 的兩種型式 tocopherol 及 tocotrienol 在動物模式的骨質疏鬆進行效用的比較，結果發現兩者皆可有意義的對骨質疏鬆具保護作用 (Nanzun et al., 2010)
4. 在成骨細胞受到 oxidative stress 時，抗氧化劑 N-acetylcystein (NAC) 具有增加 Runx2 mRNA 表達以改善 osteoblast 分化的能力 (Smith et al., 2009)
5. Devareddy 等人在切除卵巢的 postmenopausal osteoporosis 模式中，發現 blueberry 可以預防骨質疏鬆 (Devareddy et al., 2008)

貳、重要參考文獻

- Almeida M, L Han, M Martin-Millan, LI Plotkin, et al., Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem* 282, 2007, 27285–27297.
- Almeida M, M Martin-Millan, E Ambrogini, et al., Estrogens attenuate oxidative stress and the differentiation and apoptosis of osteoblasts by DNA binding-independent actions of the ER α . *J Bone Miner Res* 24, 2009, doi:10.1359/jbmr.091017
- Bai XC, D Lu, AL Liu, et al., Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblast. *J Biol Chem* 280, 2005, 17497–17506.
- Brown JP, RG Josse, Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *CMAJ* 167, 2002, S1–S34.
- Chen JR, LI Plotkin, JI Aguirre, et al., Transient versus sustained phosphorylation and nuclear accumulation of ERKs underlie anti-versus pro-apoptotic effects of estrogens. *J Biol Chem* 280, 2005, 4632–4638
- Devareddy L, S Hooshmand, JK Collins, et al., Blueberry prevents bone loss in ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Nutri Biochem* 19, 2008, 694–699.
- Garrett IR, BF Boyce, RO Oreffo, et al., Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 85, 1990, 632–639.
- Genius SJ, GK Schwalfenberg, Picking a bone with contemporary osteoporosis management: nutrient strategies to enhance skeletal integrity. *Clin Nutr* 26, 2007, 193–207.
- Hassan NM, RA Hassan, LM Abou Setta, et al., Potent Role of Dietary Phytoestrogen Plants Cultivated in Egypt Against Osteoporosis in Ovariectomized Rats. *Austral J Basic Applied Sci*, 4, 2010, 359–369.
- Huang HP, YC Chang, CH Wu, et al., Anthocyanin-rich Mulberry extract inhibit the gastric cancer cell growth in vitro and xenograft mice by inducing signals of p38/p53 and c-jun. *Food Chem* 129, 2011, 1703–1709.
- Khosla S, “Pathogenesis of osteoporosis” in *Translational Endocrinology & Metabolism*, The Endocrine Society 1, 2010, pp55–86.
- Khosla S, LJ Melton III, BL Riggs, The Unitary Model for Estrogen Deficiency and the Pathogenesis of Osteoporosis: Is a Revision Needed? *J Bone Mineral Res*, 26, 2011, 441–451.

- Kousteni S, L Han, JR Chen et al., Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J Clin Invest* 111, 2003, 1651–1664
- Kousteni S, T Bellido, LI Plotkin, et al., Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*, 104, 2001, 719–730.
- Lean JM, CJ Jagger, B Kirstein, et al., Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology* 146, 2005, 728–735.
- Levasseur R, R Barrios, F Elefteriou, et al., Reversible skeletal abnormalities in glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Endocrinology* 144, 2003, 2761–2764.
- Mackinnon ES, Rao AV, Josse RG, et al., Supplementation with the antioxidant lycopene significantly decreases oxidative stress parameters and the bone resorption marker N-telopeptide of type I collagen in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 22, 2011, 1091–1101.
- Nakamura T, Y Imai, T Matsumoto, et al., Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 130, 2007, 811–823.
- Nazrun AS, M Norazlina, M Norliza et al., Comparison of the effects of tocopherol and tocotrienol on osteoporosis in animal models, *international J Pharmacol*, 6, 2010, 561-568.
- New SA, SP Robins, MK Campbell, et al., Dietary influences on bone mass and bone metabolism, further evidence of a positive link between fruit and vegetable consumption and bone health? *Am J Clin Nutr* 71, 2000, 142–151.
- Ou TT, MJ Hsu, KC Chan, et al., Mulberry inhibits oleic acid-induced lipid accumulation via reduction of lipogenesis and promotion of hepatic lipid clearance. *J Sc. Food Agric* 91, 2011, 2740-2748.
- Parhami F, Possible role of oxidized lipids in osteoporosis: could hyperlipidemia be a risk factor? *Prost Leuk Essent Fatty Acids* 68, 2003, 373–378.
- Peng CH, LK Liu, CM Chuang, et al., Mulberry water extracts possess an anti-obesity effect and ability to inhibit hepatic lipogenesis and promote lipolysis. *J Agric Food Chem* 59, 2011, 2663-2671.
- Ruiz-Ramos M., LA Vargas, TI Fortoul Van Der Goes et al., supplementation of ascorbic acid and alpha-tocopherol in useful to preventing bone loss linked to oxidative stress in elderly. *J Nutri Health & Aging*, 14, 2010.
- Shuida AN, LL Ping, N Muhammada, et al., The effects of *Labisia pumila* var. *alata* on bone markers and bone calcium in a rat model of post-menopausal osteoporosis. *J Ethnopharmacol* 133, 2011, 538–542.
- Smith SS, JR Reyes, KS Arbon, et al., Cadmium-induced decrease in RUNX2 mRNA expression and recovery by the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) in the human osteoblast-like cell line, Saos-2. *Toxicol Vitro* 23, 2009, 60-66.
- Yabe, et al: Investigation of the origin of the osteoclast by use of transplant- tation on chick chorio- allantoic membrane. *Clin Orthop* 197, 1985, 255.

四、研究方法

(1) 桑椹水萃物 (MWE) 的製備

取用苗栗農改所之苗桑一號 (voucher specimen 76C001)，將新鮮果實冷凍乾燥後再磨成粉末，取 100 克桑椹粉末，加 1000 ml 的二次水(ddH₂O)，4 °C 下攪拌 2 小時，使用 3500rpm 離心 20 分鐘，抽取上清液，將上清液集中放進容器中，離心下來的沉澱物，加入 500ml 的二次水，放在 4 °C 冷房再攪拌 overnight。第二、三天操作步驟，同第一天。第三天收集上清液完畢，所有上清液在冷凍乾燥後磨成粉末。而後將其避光保存於-20 °C 冷凍庫。

(2) 動物處理

由台大實驗動物中心提供 4-6 週齡 (150-175 g)，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%、動物給予自來水及標準大鼠飼料，自由進食及飲水。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，將動物單獨置於一籠待傷口復原，約 10 天後傷口復原，以胃管餵食桑椹水萃物 (每天一次)。桑椹萃物給予的量為每日依照攝食飼料乾重比例給予 (如每日攝食 20 克飼料，"0.5%" 即為 0.1 克之桑椹萃物)，為避免個體間食量的差異，因此利用專用之胃管，分別餵食不同劑量的桑椹萃物 (0.25%, 0.5%, 1.0%)。每隔兩週採集尾巴靜脈血做生化值分析。於第九週犧牲取得血液及股骨、脊椎骨組織進行分析。

將動物分成八組，每組 10 隻 Rats，如下：

Normal group: 餵食正常飲食，不給任何處理。

Normal group + 1% MWEs: 餵食正常飲食，另管餵 1% MWEs。

Sham group: 餵食正常飲食，只做開皮手術，不切除卵巢。

Sham group+ 1% MWEs: 餵食正常飲食，只做開皮手術，不切除卵巢。另管餵 1% MWEs

OVX: 切除兩邊卵巢。

OVX+ 0.25 % MWEs: 切除兩邊卵巢。餵食正常飲食，另管餵 0.25 % MWEs。

OVX+ 0.5 % MWEs: 切除兩邊卵巢。餵食正常飲食，另管餵 0.5 % MWEs。

OVX+ 1 % MWEs: 切除兩邊卵巢。餵食正常飲食，另管餵 1 % MWEs。

(3) 石蠟組織包埋與切片

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，再以 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 5µm 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。

(4) 免疫組織染色

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。

五、結果與討論

女性骨質流失最快的時期是停經後五年間，脊椎密度平均每年減少 3-6%，而超過 50% 年過 80 歲的女性會有骨折的經歷。男性骨質流失的速率則較為穩定，在達平均巔峰骨骼質量後，依據不同部位，每年流失約 0.5-2%。依行政院衛生署統計，台灣 70 歲以上老年人口有 8 成 6 出現骨質流失或骨質疏鬆現象，但 50 歲以下民眾也有近 4 成骨質開始流失或疏鬆。隨著人口高齡化，台灣 65 歲以上人口約有 50 萬人罹患骨質疏鬆症，每年更有 6 萬人因骨質疏鬆而造成脊椎骨折，而老化人口在台灣急速增加，骨質疏鬆人口相對益加增多。世界衛生組織警告，骨質疏鬆已成為僅次於心血管疾病的第二大慢性疾病，易於造成骨骼變得脆弱且容易造成骨折¹。雌激素是目前用來治療停經後婦女骨質疏鬆症的標準治療方法，利用雌激素補充容易造成其他的婦科疾病，例如子宮內膜癌，乳癌等等^{2,3}。近年來的研究發現許多豆科、菊科以及一些草本植物含有類似雌激素及生物功能的成分，可以預防骨質流失及增加骨質的密度⁴⁻⁶。過去的文獻指出，當身體失去雌激素的保護，體內的氧化壓力會增加而去抑制 Osteoblast (OB) 分化並增加 Osteoclast (OC) 的分化^{7,8}。本研究結果指出，當雌激素缺乏 (卵巢去除) 時，骨骼中確實會出現骨小樑有明顯變薄變疏的骨質疏鬆的現象 (圖一)，且血液中的 ALP 也會增加 (表一)，但在給予桑葚萃物後，此種骨質疏鬆的現象將獲得緩解。

桑葚是桑科桑屬多年生木本植物桑樹的果實，過去許多研究指出，桑葚含有多種的多酚及花青素，且具有抗氧化、抗發炎及抗癌的能力⁹⁻¹¹。根據之前的研究指出，許多莓果類 (如：覆盆子、藍莓、黑莓、草莓等等) 具有預防骨質疏鬆以及強化骨密度的能力，Jin-Ran Chen 等人在 2013 年的研究顯示，在青春前期短期的補充藍莓可以預防骨基質的分解，達到減緩成骨細胞的老化。同時 Bahram H. Arjmandi 等人的研究也證實藍莓可以抑制成骨細胞的分化達到預防骨質流失及增加骨密度的功效¹²⁻¹⁴。這些莓果類植物並未被明確指出具有植物雌激素的功效，但他們都被指出具有良好的抗氧化特性。在生物體中有許多可以減緩氧化壓力的酵素，例如：Superoxide dismutase (SOD)，catalase，glutathione peroxidase (GSH) 等，根據過去的研究指出，第一型血色素氧化酵素 (heme oxygenase 1) 為血色素氧化酶的一種，可由金屬離子、過氧化物、發炎激素等刺激物透過活化 antioxidant response element (ARE) 所誘導產生，HO-1 活化後會將 heme 分解代謝成為膽綠素、膽紅素、鐵離子以及一氧化碳。膽綠素和膽紅素為體內的抗氧化劑，可保護細胞免於抗自由基造成的傷害與細胞凋亡¹⁵。因此 HO-1 的生成，可做為一種細胞受到氧化壓力傷的指標。所以我們比較骨骼檢體中 HO-1 的表現量，以得知檢體中氧化程度。結果發現當雌激素缺乏時，組織中的氧化壓力較高，而桑葚水萃物可以改善組織中的氧化壓力 (圖二)。這提供了延緩停經後骨質疏鬆的另一種思維，也許在保健食品的補充上面，針對抗氧化性的物質給予也是一種選項。

在骨質疏鬆的骨髓中也會發現脂肪細胞增加的現象，脂肪細胞及成骨細胞係屬於同源間質幹細胞分化而來，在雌激素缺乏時，成骨細胞分化減少會相對使脂肪細胞增加，我們在此研究中發現雌激素缺乏確實會使成骨細胞分化調節因子 Runx2 減少 (圖三)，但給予桑葚水萃物後會改善這種狀態。Runx2 是一種控制骨骼發育的轉錄因子，它會透過調節成骨細胞的成熟以及分化過程中許多蛋白質的基因的表現¹⁶，並在外在壓力以及一些內在激素的作用之下，活化訊息路徑，如：MAPK、PKA、Smad 進而磷酸化 Runx2¹⁷，活化的 Runx2 可與 RANKL 和 OPG 的基因驅動子 (promoter) 結合¹⁸，並影響蝕骨細胞的活性。根據先前的研究，Runx2 蛋白的減少，會促使過氧化和酶體增值物激活 γ 2 (PPAR γ 2) 轉率因子的作用，促進骨髓內間質幹細胞分化成脂肪細胞，過多的脂肪細胞的堆積會對成骨細胞產生毒性作用。在脂肪細胞與成骨細胞共同培養的實驗結果指出，脂肪細胞會抑制成骨細胞的活性及存活率¹⁹。在股骨的免疫組織染色中也觀察到 RANK 及 RANKL 蛋白都有增加的趨勢 (圖四及圖五)。根據過去的研究指出，RANK 及 RANKL 與 OC 的分化及成熟相關^{20,21}。本實驗利用不同劑量的桑葚水萃物 (MWE) 餵食去卵巢大鼠，實驗結果證實，隨著餵食桑葚水萃物的劑量增加，股骨的骨小梁變厚變密的現象，且脂肪細胞的堆積也有逐漸減少的趨勢。在免疫組織染色的結果發現與蝕骨細胞分化及成熟有關的 RANK 及 RANKL 均隨著

桑葚水萃物的濃度增加而減少，原因為去除卵巢而減少的 Runx2 蛋白，亦隨著桑葚水萃物的濃度增加而回復表現。

結合以上討論，桑葚水萃物改善去除卵巢大鼠骨質疏鬆的症狀，主要的生理機制可能是透過桑葚水萃物的抗氧化能力，抑制失去雌激素所造成的氧化傷害來達到預防骨質疏鬆的效果。在未來的實驗中，我們將進一步的利用細胞模式來探討桑葚水萃物對於骨骼內的細胞可能產生的影響以及其中可能的機制。希望能藉由細胞實驗的結果，提出更為完整的理論，證實桑葚水萃物內涵的功能性成分，達到延緩停經後的女性及老年人的骨質疏鬆症。

討論之文獻引用

1. JA Kanis. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet* 2002, 359: 1929-1936.
2. JA Cauley, DG Seeley, K Ensrud, B Ettinger, D Black, SR Cummings. Estrogen replacement therapy and fractures in older women. *Ann Intern Med* 1995, 122: 9-16.
3. RK Ross, A Paganini-Hill, PC Wan, MC Pike. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J Nat Cancer Inst* 2000, 92: 328-332.
4. SN Fathilah, S Abdullah, N Mohamed, AN Shuid. Labisia pumila prevents complications of osteoporosis by increasing bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *ECAM* 2012, 7 pages.
5. N Mohamed, Z Sahhugi, ESM Ramli, N Muhammad. The effects of *Cosmos caudatus* (ulam raja) on dynamic and cellular bone histomorphometry in ovariectomized rats. *BMC Res* 2013, 6:239.
6. SSM Zaid, SA SulaimanI, NH Othman, IN Soelaiman, AN Shuid, N Mohamad, N Muhamad. Protective effects of Tualang honey on bone structure in experimental postmenopausal rats. *Clinics* 2012, 67: 779-784.
7. XC Bai, D Lu, J Bai, H Zheng, ZY Ke, XM Li, SQ Luo. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF- κ B. *BBRC* 2004, 314: 197-207.
8. F Wauquier, L Leotoing, V Coxam, J Guicheux, Y Wittrant. Oxidative stress in bone remodeling and disease. *Trends Mol Med* 2009, 15: 468-477.
9. XL Yang, L Yang, HT Zheng. Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. *Food Chem Toxicol* 2010, 48: 2374-2379.
10. CJ Liu, JY Lin. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of strawberry and mulberry fruit polysaccharides on lipopolysaccharide-stimulated macrophages through modulating pro-/anti-inflammatory cytokines secretion and Bcl-2/Bak protein ratio. *Food Chem Toxicol* 2012, 50: 3032-3039.
11. HP Huang, YC Chang, CH Wu, CN Hung, CJ Wang. Anthocyanin-rich Mulberry extract inhibit the gastric cancer cell growth in vitro and xenograft mice by inducing signals of p38/p53 and c-jun. *Food Chemistry* 2011, 129: 1703-1709.
12. J Zhang, OP Lazarenko, ML Blackburn, K Shankar, TM Badger, MJJ Ronis, JR Chen. Feeding Blueberry Diets in Early Life Prevent Senescence of Osteoblasts and Bone Loss in Ovariectomized Adult Female Rats. *PLoS One* 2011, 6: e24486
13. J Zhang, OP Lazarenk, J Kang, ML Blackburn, MJJ Ronis, TM. Badger, JR Chen. Feeding Blueberry Diets to Young Rats Dose-Dependently Inhibits Bone Resorption through Suppression of RANKL in Stromal Cells. *PLoS One* 2013, 8: e70438.
14. L Devareddy, S Hooshmand, JK Collins, EA Lucas, SC Chai, BH Arjmandi. Blueberry prevents bone loss in ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Nutri Biochem* 2008, 19: 694-699.
15. T Komori. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell*

Tissue Res 2010, 339: 189–195.

16. RT Franceschi, G Xiao. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem* 2003, 88: 446–454.
17. K Thirunavukkarasu, DL Halladay, RR Miles, X Yang, RS Galvin, S Chandrasekhar, TJ Martin, JE Onyia. The osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function.” *J Biol Chem* 2000, 275: 25163-25172.
18. S Zhou, JS Greenberger, MW Epperly, JP Goff, C Adler, MS LeBoff, J Glowack. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell* 2008, 7: 335-343.
19. T Wada, T Nakashima, N Hiroshi, JM Penninger. RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease.” *Trend Mol Med* 2006, 12: 17-25.
20. JW Lee, A Iwahashi ,SI Hasegawa, T Yonezawa, WB Jeon, BY Cha, K Nagai, JT Woo. Coptisine inhibits RANKL-induced NF- κ B phosphorylation in osteoclast precursors and suppresses function through the regulation of RANKL and OPG gene expression in osteoblastic cells. *J Nat Med* 2012, 66:8–16.
21. R Gozzelino, V Jeney, MP Soares. Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010, 50: 323–354.

Table 1 Biochemical parameters of plasma in MWE treating OVX-rats

	Normal	Normal+1%MWE	OVX	OVX+0.5%MWE	OVX+1%MWE	Sham	Sham+1%MWE
ALT(IU/L)	56.1±11.5	49.4±6.1	54.8±3.5	50.7±8.1	52.5±3.5	51.7±6	49.7±6.5
AST(IU/L)	129±25.3	127.8±29.6	185.6±35.3*	120.5±23.6##	114.2±17.9##	113.8±7.8	118.4±17.7
HDL-C(mg/dl)	32.5±2.2	32.5±2.9	39.7±2.4	33±2.9	36.9±2	29±3.1	32.9±2
LDL-C(mg/dl)	7.4±1.4	6.7±1.3	8.7±1.1	7.7±0.8	8.5±1.6	6.9±1.1	7.3±0.9
Triglycerides(mg/dl)	98.9±19.7	120.8±40.0	81.7±16.5	65.9±12.2	72.2±11.7	85.7±22.6	89.8±21.8
Total cholesterol(mg/dl)	74.9±7.0	74.8±5.7	94.7±5.4	85.3±10.6	97.6±8.5	77.9±7.0	74.4±6.0
ALP(mg/dl)	114.2±18.9	132.1±19.0	241.3±57.4##	184.0±27.7*	142.8±23.2##	110.9±31.7	109.3±13.9

Data show as mean ± SD.

*, P<0.05 , compared with OVX group

#, P<0.005, compare with Normal group

##, P<0.001, compared with Normal group

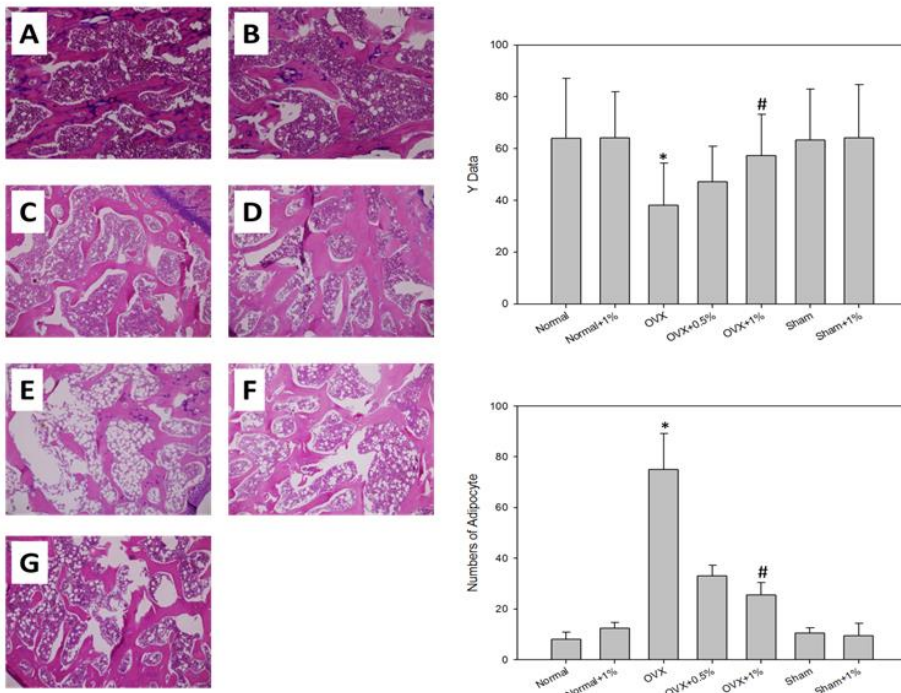


Figure 1. Treatment of MWE can reduce adipocyte area and increase bone trabecular in femur significantly. A, normal; B, normal with 1% MWE; C, sham; D, sham with 1% MWE; E, OVX; F, OVX with 0.5% MWE; G, OVX with 1% MWE. Data shown as mean±SD. *, P<0.05, compared with normal group; #, P<0.05, compared with OVX group.

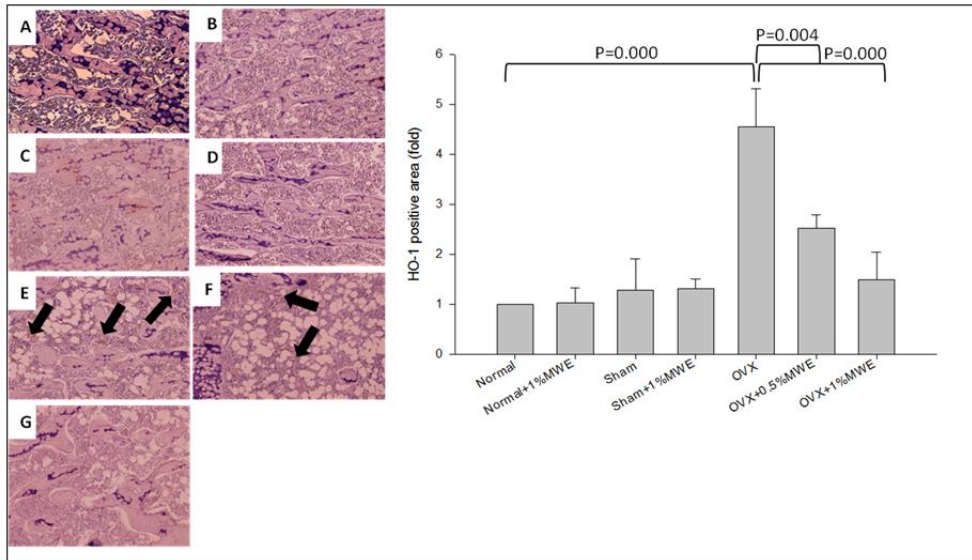


Figure 2. Treatment of MWE can reduce the expression of HO-1. A, normal; B, normal with 1% MWE; C, sham; D, sham with 1% MWE; E, OVX; F, OVX with 0.5% MWE; G, OVX with 1% MWE. Data shown as mean±SD. *, P<0.05, compared with normal group; #, P<0.05, compared with OVX group.

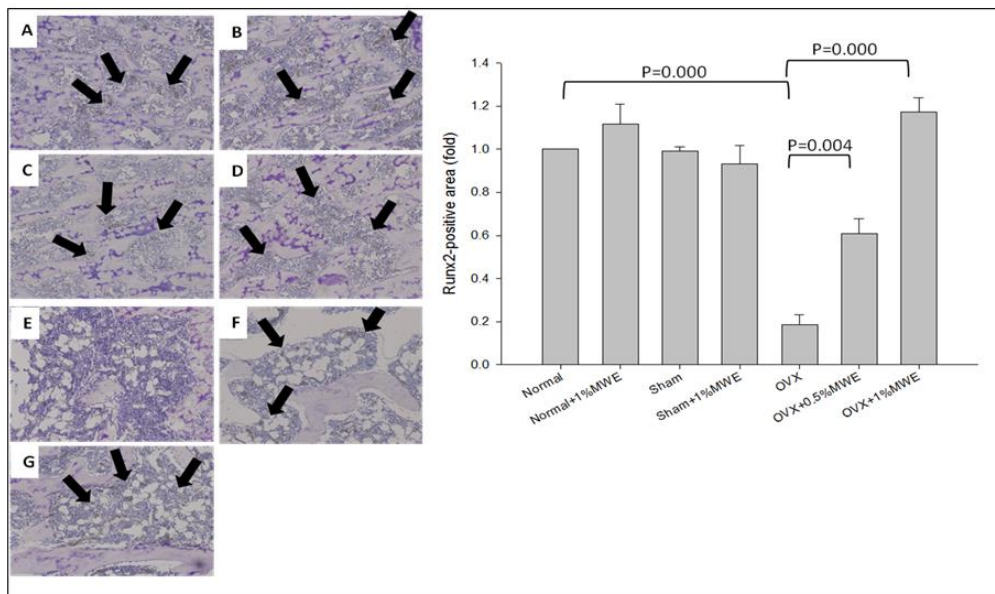


Figure 3. Treatment of MWE can reduce the expression of Runx 2. A, normal; B, normal with 1% MWE; C, sham; D, sham with 1% MWE; E, OVX; F, OVX with 0.5% MWE; G, OVX with 1% MWE. Data shown as mean±SD. *, P<0.05, compared with normal group; #, P<0.05, compared with OVX group.

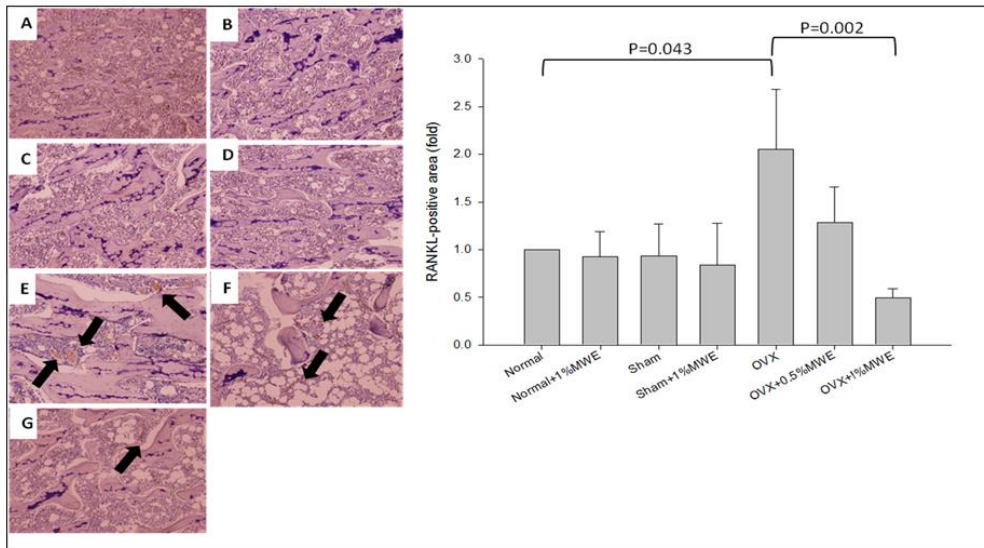


Figure 4. Treatment of MWE can reduce the expression of RANKL. A, normal; B, normal with 1% MWE; C, sham; D, sham with 1% MWE; E, OVX; F, OVX with 0.5% MWE; G, OVX with 1% MWE. Data shown as mean \pm SD. *, P<0.05, compared with normal group; #, P<0.05, compared with OVX group.

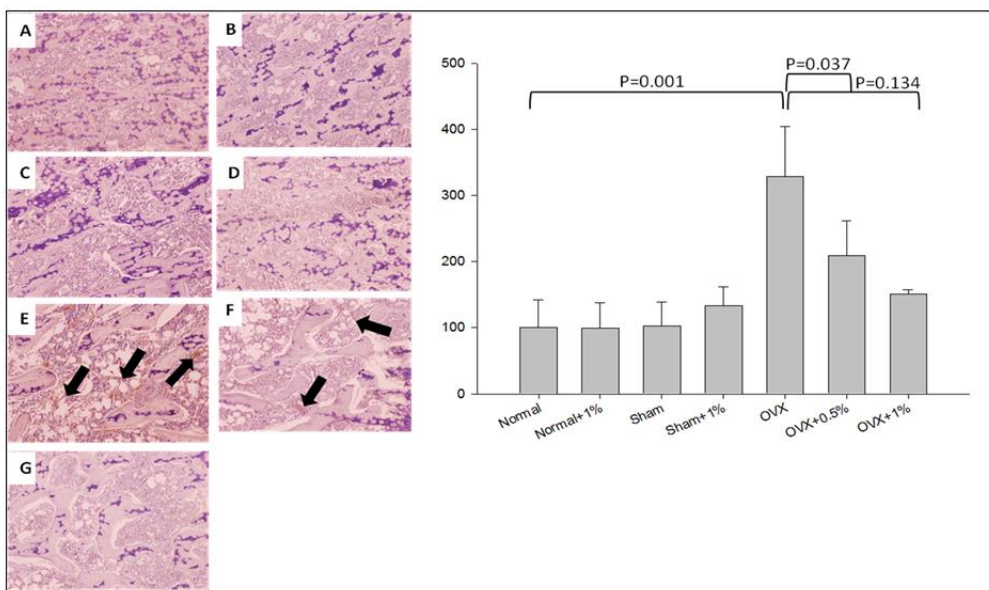


Figure 5. Treatment of MWE can reduce the expression of RANK. A, normal; B, normal with 1% MWE; C, sham; D, sham with 1% MWE; E, OVX; F, OVX with 0.5% MWE; G, OVX with 1% MWE. Data shown as mean \pm SD. *, P<0.05, compared with normal group; #, P<0.05, compared with OVX group.

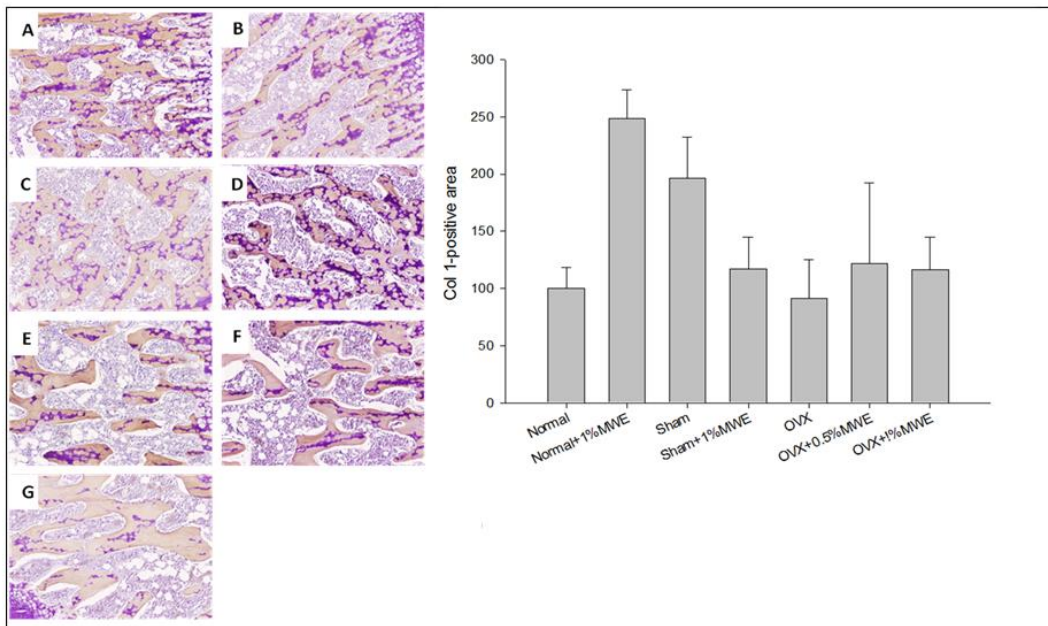


Figure 6. Treatment of MWE cannot affect the expression of type 1 collagen. A, normal; B, normal with 1% MWE; C, sham; D, sham with 1% MWE; E, OVX; F, OVX with 0.5% MWE; G, OVX with 1% MWE. Data shown as mean±SD. *, P<0.05, compared with normal group; #, P<0.05, compared with OVX group.

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

已將部分研究成果以研討會論文形式分別發表於 2012 ISNFF 研討會 (Hsing-You Rao, Chau-Jong Wang, Huei-Jane Lee, Mulberry water extracts improve osteoporosis in experimental ovariectomic rat, Hawaii, US)

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

1. 學術成就: 本研究發現本土桑葚 (76C001) 在卵巢切除的大白鼠中具有延緩骨質疏鬆的效用，在進一步檢測確認後發現這種作用可能來自於桑葚的抗氧化特性而非植物雌激素作用。另外，桑葚也在骨質疏鬆的骨骼中調節了成骨細胞的生長以達到延緩骨質疏鬆的作用。

2. 技術創新: 本研究發現桑葚除了抗癌抗氧化等作用外，具有延緩停經後骨質疏鬆的作用，之前並無研究提及桑葚與延緩骨質疏鬆的關聯。

3. 社會影響: 對於習慣於桑葚產期以桑葚醃製，醋釀或生食的台灣民眾而言，本研究提供了民眾在食用桑葚相關產品時，可獲得的另種功效，也有助於栽種桑葚的農民及業界對桑葚有更多推廣的學術立基。

國科會補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：__年__月__日

計畫編號	NSC 101-2320-B-040-009		
計畫名稱	桑椹萃取物及功能性成分在卵巢切除之大白鼠引起骨質疏鬆的延緩作用及機轉之研究		
出國人員姓名	李慧禎	服務機構及職稱	中山醫學大學醫學院醫學系生化科教授
會議時間	101年12月1日至 101年12月6日	會議地點	美國夏威夷
會議名稱	(中文)國際營養與功能性食品大會 (英文)ISNFF		
發表題目	(中文)桑葚水萃取物在實驗性卵巢切除大白鼠中可改善骨質疏鬆 (英文) Mulberry water extracts improve osteoporosis in experimental ovariectomic rat		

一、參加會議經過

此次會議為 2012 年國際營養與功能性食品大會，本人係前往參與大會並發表看板論文。會議期間為 2012/12/01-2012/12/06，所以在 11/30 上午偕同本研究室二位研究生一同搭乘高鐵往桃園機場，搭中華航空經日本成田機場轉機至夏威夷。我們於 2012/12/02 下午至 Courtyard King Kamehameha's Kona Beach Hotel 完成報到與註冊手續。本次會議中個人提出的報告時間為 12/05 上午 8:30-17:30，論文題目為” Mulberry water extracts improve osteoporosis in experimental ovariectomic rat”。我們以切除卵巢模擬人類雌激素缺乏狀態，在雌性大白鼠中發現，台灣擁有品種權的苗桑一號 (76C001) 之桑果水萃取物具有延緩卵巢切除引發骨質疏鬆的現象，而這些現象可能源自於桑椹水萃取物的抗氧化特性。在組織切片中，骨質疏鬆時，骨髓中所增加的脂肪比例，在處理桑椹的組別中，也可以發現脂肪的比例顯著下降。在蛋白檢查中，我們也發現桑椹水萃取物會調節骨組織中的成骨細胞分化系統及蝕骨細胞增生系統，並改善骨質中氧化狀態。因此結果推測桑椹水萃取物應可應用為改善雌激素缺乏而引起骨質疏鬆時的保健食品。

二、與會心得

本次議程安排略顯凌亂，但與會之海報展示或口頭論文發表及專題演講場地集中，便於選擇感興趣的主題觀看或聆聽。在本人近期進行的功能性食品研究領域，也看到不少新的想法及廠商展示的商品化產品。對於同行的學生則以實際的介紹及引領，讓他們的想法及做法能較貼近國際，深感獲益良多。

三、發表論文全文或摘要

Previous studies showed that ovariectomy-induced osteoporosis can increase oxidative stress and cause bone loss. It was documented Mulberry possessed a good antioxidative ability. Herein, we used mulberry water extracts (MWEs) to feed the ovariectomic rat, and further to examine the potential

mechanisms. In our investigation, the level of plasma alkaline phosphatase (ALP) in ovariectomic rat increased significantly. After MWEs given for 8 weeks, ALP was reduced. We also found the ration of adipocyte /osteoblast increased dominantly in bone mass of ovariectomic rat femur, and MWEs ameliorated the condition significantly. The oxidative status in femur was improved in MWEs-fed rat. Thereby, the ovariectomy-induced osteoporosis can be decelerated by MWEs, it might be due to its antioxidative ability. Our findings showed that MWEs have the potentials to develop a functional food in postmenopausal syndrome to prevent the women from osteoporosis.

四、建議

本次會議有不少來自台灣的學者，藉由會議進行與來自許多國家的學者相互交流學術意見，並增加彼此認識的機會。此外，亦可相互學習人際互動及禮節，政府單位應以實際作為多加鼓勵國際學術交流。

五、攜回資料名稱及內容



P190. Mulberry water extracts improve osteoporosis in experimental ovariectomic rat

Hsing-Yu Jao¹, Chien-Shen Lo², Chau-Jong Wang¹, Yi-Ru Lee^{1,3}, Hwei-Jane Lee^{1,4}
¹Institute of Biochemistry and Biotechnology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan; ²Department of Orthopedics, Show-Chwan Memorial Hospital, Changhua, Taiwan; ³Department of Pathology, Chung Shan Medical University Hospital, Taichung, Taiwan; ⁴Department of Biochemistry, School of Medicine, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

Menopause is a major cause to induce osteoporosis in women. Osteoporosis is highly relative to oxidative stress. Mulberry was showed to possess good anti-oxidative ability. Here, mulberry water extract (MWE) was fed the ovariectomic rat to explore the potential mechanisms in osteoporosis. The results showed plasma alkaline phosphatase (ALP) increased significantly in ovariectomic rat. After MWEs given for 8 weeks, ALP was reduced. The ratio of adipocyte to osteoblast increased and trabecular bone density reduced dominantly in femur bone of ovariectomic rat, and MWE ameliorated the condition significantly. MWE also improved the anti-oxidation status due to increasing the expression of Heme oxygenase-1 (HO-1) in ovariectomic rat. The results showed MWE can increase the expression of Runx2 and decrease RANK/RANKL in ovariectomic rat; it revealed MWE might regulate the osteoblast differentiation and osteoclast proliferation. The present results point that MWE have the potential to decelerate the postmenopausal women from osteoporosis.

P191. A cystine-rich whey supplement (Immunocal) provides GSH-dependent neuroprotection *in vitro* and delays disease onset while preventing GSH depletion in the hSOD1^{G93A} mouse model of ALS

Erika Ross, Heather Wilkins, Vamsi Daliparthi, Aimee Winter, Whitney Hulick, Danielle Kirchof, Nathan Duval, David Patterson, Daniel Linseman
Department of Biological Sciences and Eleanor Roosevelt Institute, University of Denver, 2199 S. University Blvd., Denver, Colorado 80208, USA

Immunocal® is a unique whey protein supplement that provides cystine, an essential precursor for synthesis of the antioxidant glutathione (GSH). In cultured cerebellar granule neurons, Immunocal® protected against mitochondrial oxidative stress induced by inhibition of pro-survival Bcl-2. This effect was prevented by co-incubation with a γ -glutamylcysteine ligase inhibitor, demonstrating that *de novo* synthesis of GSH was required. Similarly, Immunocal® significantly decreased NSC34 motor neuronal cell death induced by H₂O₂ or glutamate. In the hSOD1^{G93A} mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Immunocal® treatment delayed disease onset by 7.0 ± 1.1 days and significantly decreased the rate of decline in grip strength compared to transgenic control mice. Finally, lumbar spinal cord GSH was depleted by nearly 50% in end-stage hSOD1^{G93A} mice and this reduction was prevented by Immunocal®. These findings suggest that sustaining GSH via cystine supplementation with Immunocal® delays the onset of ALS through suppression of oxidative stress and excitotoxicity.

Effect of Mulberry water extracts Improve Osteoporosis of Ovariectomized Rat

Hsing-You Rao¹, Chau-Jong Wang¹, Hwei-Jane Lee^{1,2}

¹ Institute of Biochemistry and Biotechnology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan.
² Department of Biochemistry, School of Medicine, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan.

Abstract
 Menopause is a major cause to induce osteoporosis in women. Osteoporosis is highly relative to oxidative stress. Mulberry was shown to possess good anti-oxidative ability. Here, mulberry water extract (MWE) was fed the ovariectomized rat to explore the potential mechanisms in osteoporosis. The results showed plasma alkaline phosphatase (ALP) increased significantly in ovariectomized rat. After MWEs given for 8 weeks, ALP was reduced. The ratio of adipocyte to osteoblast increased and trabecular bone density reduced dominantly in femur bone of ovariectomized rat, and MWE ameliorated the condition significantly. MWE also improved the antioxidant status due to increasing the expression of Heme oxygenase-1 (HO-1) in ovariectomized rat. The results showed MWE can increase the expression of Runx2 and decrease RANK/RANKL in ovariectomized rat; it revealed MWE might regulate the osteoblast differentiation and osteoclast proliferation. The present results point that MWE have the potential to decelerate the postmenopausal women from osteoporosis.

Experimental design

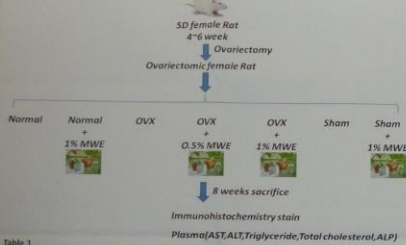


Table 1
 Comparison of serum of AST, ALT, HDL-C, LDL-C, triglyceride, total cholesterol, and ALP after treatment of MWE.

Item	Normal	Ovx	Ovx + 0.5% MWE	Ovx + 1% MWE	Sham	Sham + 1% MWE
AST (U/L)	36.812	47.51	36.781	32.151	33.79	37.91
ALT (U/L)	100.2	127.818	101.217	114.217	111.71	114.217
HDL-C (mg/dl)	81.912	81.912	78.724	82.2	81.92	78.1
LDL-C (mg/dl)	143.4	171.1	137.1	133.1	131.4	136.1
Triglyceride (mg/dl)	38.317	120.812	41.718	41.912	42.112	41.812
Total cholesterol (mg/dl)	74.912	142.17	94.714	81.912	77.912	74.912
ALP (U/L)	184.218	181.218	161.218	161.218	128.217	181.218

Total show as mean ± SD
 * P < 0.05, compared with Ovx group
 # P < 0.05, compared with Normal group
 ## P < 0.001, compared with Normal group

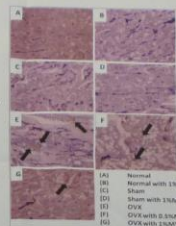


Figure 2. Treatment of MWE can reduce RANK expression in femur bone. Arrow pointed out showed the RANK-positive area in bone marrow (brown area)

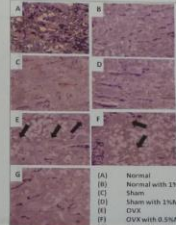


Figure 3. Treatment of MWE can reduce HO-1 expression in femur bone. Arrow pointed out showed the HO-1-positive area in bone marrow (brown area)

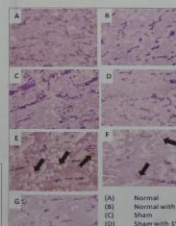


Figure 4. Treatment of MWE can reduce RAN expression in femur bone. Arrow pointed out showed the RAN-positive area in bone marrow (brown area)

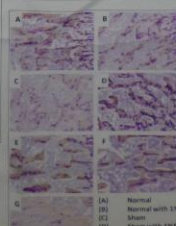


Figure 5. Treatment of MWE can not affect type collagen expression in femur bone

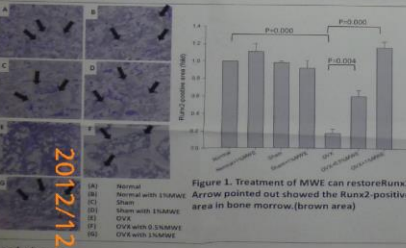
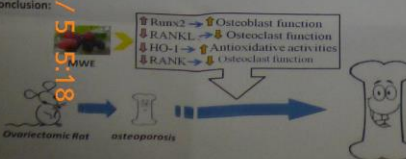


Figure 1. Treatment of MWE can restore Runx2. Arrow pointed out showed the Runx2-positive area in bone marrow (brown area)



六、其他

本場次主要以天然萃物對代謝性疾病的功效探討，另外在其他場次，個人也瀏覽他國學者的研究，發現近期研究除功能性食品的成分分析及作用探討外，部分研究也著重於增強記憶及抗老化，對於台灣老年化的人口結構，這應是可以再加著墨之處。

參與 2012 ISNFF Annual Conference 心得報告

參加會議經過

此次會議為2012年國際營養與功能性食品大會，本人係前往參與大會並發表看板論文。會議期間為2012/12/01-2012/12/06 (圖一，大會議程及發表論文摘要)，所以在11/30上午偕同本研究室二位研究生一同搭乘高鐵往桃園機場，搭中華航空經日本成田機場轉機至夏威夷。我們於2012/12/02下午至Courtyard King Kamehameha' s Kona Beach Hotel完成報到與註冊手續。本次會議中個人提出的報告時間為12/05上午8:30-17:30，論文題目為” **Mulberry water extracts improve osteoporosis in experimental ovariectomic rat**” (圖二，論文海報)。我們以切除卵巢模擬人類雌激素缺乏狀態，在雌性大白鼠中發現，台灣擁有品種權的苗桑一號 (76C001) 之桑果水萃物具有延緩卵巢切除引發骨質疏鬆的現象，而這些現象可能源自於桑椹水萃物的抗氧化特性。在組織切片中，骨質疏鬆時，骨髓中所增加的脂肪比例，在處理桑椹的組別中，也可以發現脂肪的比例顯著下降。在蛋白檢查中，我們也發現桑椹水萃物會調節骨組織中的成骨細胞分化系統及蝕骨細胞增生系統，並改善骨質中氧化狀態。因此結果推測桑椹水萃物應可應用為改善雌激素缺乏而引起骨質疏鬆時的保健食品。

本場次主要以天然萃物對代謝性疾病的功效探討，另外在其他場次，個人也瀏覽他國學者的研究，發現近期研究除功能性食品的成分分析及作用探討外，部分研究也著重於增強記憶及抗老化，對於台灣老年化的人口結構，這應是可以再加著墨之處。

與會心得

本次議程安排略顯凌亂，但與會之海報展示或口頭論文發表及專題演講場地集中，便於選擇感興趣的主題觀看或聆聽。在本人近期進行的功能性食品研究領域，也看到不少新的想法及廠商展示的商品化產品。對於同行的學生則以實際的介紹及引領，讓他們的想法及做法能較貼近國際，深感獲益良多。

結語

本次會議有不少來自台灣的學者，藉由會議進行與來自許多國家的學者相互交流學術意見，並增加彼此認識的機會。此外，亦可相互學習人際互動及禮節，

政府單位應以實際作為多加鼓勵國際學術交流。

<圖一>



P190. Mulberry water extracts improve osteoporosis in experimental ovariectomic rat

Hsing-Yu Jao¹, Chien-Shen Lo², Chau-Jong Wang¹, Yi-Ru Lee^{1,3}, Huei-Jane Lee^{1,4}
¹Institute of Biochemistry and Biotechnology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan; ²Department of Orthopedics, Show-Chwan Memorial Hospital, Changhua, Taiwan; ³Department of Pathology, Chung Shan Medical University Hospital, Taichung, Taiwan; ⁴Department of Biochemistry, School of Medicine, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

Menopause is a major cause to induce osteoporosis in women. Osteoporosis is highly relative to oxidative stress. Mulberry was showed to possess good anti-oxidative ability. Here, mulberry water extract (MWE) was fed the ovariectomic rat to explore the potential mechanisms in osteoporosis. The results showed plasma alkaline phosphatase (ALP) increased significantly in ovariectomic rat. After MWEs given for 8 weeks, ALP was reduced. The ratio of adipocyte to osteoblast increased and trabecular bone density reduced dominantly in femur bone of ovariectomic rat, and MWE ameliorated the condition significantly. MWE also improved the anti-oxidation status due to increasing the expression of Heme oxygenase-1 (HO-1) in ovariectomic rat. The results showed MWE can increase the expression of Runx2 and decrease RANK/RANKL in ovariectomic rat; it revealed MWE might regulate the osteoblast differentiation and osteoclast proliferation. The present results point that MWE have the potential to decelerate the postmenopausal women from osteoporosis.

P191. A cystine-rich whey supplement (Immunocal) provides GSH-dependent neuroprotection *in vitro* and delays disease onset while preventing GSH depletion in the hSOD1 G93A mouse model of ALS

Erika Ross, Heather Wilkins, Vamsi Daliparthi, Aimee Winter, Whitney Hulick, Danielle Kirchof, Nathan Duval, David Patterson, Daniel Linseman
Department of Biological Sciences and Eleanor Roosevelt Institute, University of Denver, 2199 S. University Blvd., Denver, Colorado 80208, USA

Immunocal® is a unique whey protein supplement that provides cystine, an essential precursor for synthesis of the antioxidant glutathione (GSH). In cultured cerebellar granule neurons, Immunocal® protected against mitochondrial oxidative stress induced by inhibition of pro-survival Bcl-2. This effect was prevented by co-incubation with a γ -glutamylcysteine ligase inhibitor, demonstrating that *de novo* synthesis of GSH was required. Similarly, Immunocal® significantly decreased NSC34 motor neuronal cell death induced by H₂O₂ or glutamate. In the hSOD1^{G93A} mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Immunocal® treatment delayed disease onset by 7.0 ± 1.1 days and significantly decreased the rate of decline in grip strength compared to transgenic control mice. Finally, lumbar spinal cord GSH was depleted by nearly 50% in end-stage hSOD1^{G93A} mice and this reduction was prevented by Immunocal®. These findings suggest that sustaining GSH via cystine supplementation with Immunocal® delays the onset of ALS through suppression of oxidative stress and excitotoxicity.

P.198

Effect of Mulberry water extracts Improve Osteoporosis of Ovariectomized Rat

Hsing-You Rao¹, Chau-Jong Wang¹, Hwei-Jane Lee^{1,2}

¹ Institute of Biochemistry and Biotechnology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan.
² Department of Biochemistry, School of Medicine, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan.

Abstract
 Menopause is a major cause to induce osteoporosis in women. Osteoporosis is highly relative to oxidative stress. Mulberry was showed to possess good anti-oxidative ability. Here, mulberry water extract (MWE) was fed the ovariectomized rat to explore the potential mechanisms in osteoporosis. The results showed plasma alkaline phosphatase (ALP) increased significantly in ovariectomized rat. After MWEs given for 8 weeks, ALP was reduced. The ratio of adipocyte to osteoblast increased and trabecular bone density reduced dominantly in femur bone of ovariectomized rat, and MWE ameliorated the condition significantly. MWE also improved the oxidation status due to increasing the expression of Heme oxygenase-1 (HO-1) in ovariectomized rat. The results showed MWE can increase the expression of Runx2 and decrease RANK/RANKL in ovariectomized rat; it revealed MWE might regulate the osteoblast differentiation and osteoclast proliferation. The present results point that MWE have the potential to decelerate the postmenopausal women from osteoporosis.

Experimental design

Table 1
 Comparison of serum of AST, ALT, HDL-C, LDL-C, triglyceride, total cholesterol, and ALP after treatment of MWE.

Item	Normal	Normal with 1%MWE	OVX	OVX with 0.5%MWE	OVX with 1%MWE	Sham	Sham with 1%MWE
AST(U/L)	36.22±2.2	44.45±2.1	74.82±3.5	50.75±2.3	52.21±3.1	31.79	41.76±1.1
ALT(U/L)	129.23±9	127.81±9.4	249.41±9.7	120.12±10*	124.21±10*	111.87±9	111.41±10
HDL-C(mg/dl)	32.92±2	32.32±2	39.72±4	30.2±3	30.2±3	38.21	39.21±3
LDL-C(mg/dl)	74.24	6.71±1	4.71±1	7.58	8.01±1	4.91±1	7.28±1
Triglyceride(mg/dl)	98.18±7	102.81±6.3	81.75±5.1	95.81±7.2	72.11±7	95.72±6	83.22±6
Total cholesterol(mg/dl)	78.81±9	74.21±7	94.75±4	81.21±5	77.63±3	77.87±3	71.42±3
ALP(mg/dl)	184.12±8.9	182.11±8	242.35±10*	184.22±10*	182.81±10*	183.22±7	180.21±4

Data show as mean ± SD
 * P<0.05, compared with OVX group
 # P<0.05, compared with Normal group
 ## P<0.05, compared with Sham group

Figure 1. Treatment of MWE can restore Runx2. Arrow pointed out showed the Runx2-positive area in bone marrow (brown area).

Figure 2. Treatment of MWE can reduce RANKL expression in femur bone. Arrow pointed out showed the RANKL-positive area in bone marrow (brown area).

Figure 3. Treatment of MWE can reduce HO-1 expression in femur bone. Arrow pointed out showed the HO-1-positive area in bone marrow (brown area).

Figure 4. Treatment of MWE can reduce RANK expression in femur bone. Arrow pointed out showed the RANK-positive area in bone marrow (brown area).

Figure 5. Treatment of MWE can not affect type I collagen expression in femur bone.

Conclusion

- Runx2 → Osteoblast function
- RANKL → Osteoclast function
- HO-1 → Antioxidative activities
- RANK → Osteoclast function

2012/12/5 5:5:18

Ovariectomized Rat → osteoporosis

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/10/28

國科會補助計畫	計畫名稱: 桑椹萃取物及功能性成分在卵巢切除之大白鼠引起骨質疏鬆的延緩作用及機轉之研究
	計畫主持人: 李慧禎
	計畫編號: 101-2320-B-040-009- 學門領域: 保健營養
無研發成果推廣資料	

101 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：李慧禎		計畫編號：101-2320-B-040-009-					
計畫名稱：桑椹萃取物及功能性成分在卵巢切除之大白鼠引起骨質疏鬆的延緩作用及機轉之研究							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>本研究成果協助原本就有桑葚產品的產業界（燦達生物科技股份有限公司）能在發展桑葚產品時有正面學術基礎，利於推廣</p>
--	---

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科教處計畫加填項目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與（閱聽）人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

已將部分研究成果以研討會論文形式分別發表於 2012 ISNFF 研討會 (Hsing-You Rao, Chau-Jong Wang, Huei-Jane Lee, Effect of Mulberry water extracts Improve Osteoporosis of Ovariectomic Rat, Hawaii, US)

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

1. 學術成就：本研究發現本土桑葚（76C001）在卵巢切除的大白鼠中具有延緩骨質疏鬆的效用，在進一步檢測確認後發現這種作用可能來自於桑葚的抗氧化特性而非植物雌激素作用。另外，桑葚也在骨質疏鬆的骨骼中調節了成骨細胞的生長以達到延緩骨質疏鬆的作用

2. 技術創新：本研究發現桑葚除了抗癌抗氧化等作用外，具有延緩停經後骨質疏鬆的作用，之前並無研究提及桑葚與延緩骨質疏鬆的關聯

3. 社會影響：對於習慣於桑葚產期以桑葚醃製，醋釀或生食的台灣民眾而言，本研究提供了民眾在食用桑葚相關產品時，可獲得的另種功效，也有助於栽種桑葚的農民及業界對桑葚有更多推廣的學術立基