

東海大學食品科學系碩士班

Master of Food Science

Tunghai University

食品科技組

Food Technology Section

大豆蛋白之胰蛋白酶水解物及其純化胜肽對卵巢切除誘導骨
質疏鬆症小鼠之改善作用

Ameliorating effect of trypsin-soy protein hydrolysate and its
isolated peptide on ovariectomized-induced osteoporosis mice

指導老師：江文德 博士

蔣慎思 博士

Advisor : Wen-Dee Chiang, Ph.D.

Shen-Shih Chiang, Ph.D.

張文彥

Wen-Yen Chang

中華民國一百零八年五月

May, 2019

目錄

目錄.....	II
圖目錄.....	V
表目錄.....	VII
摘要.....	VIII
Abstract	X
壹、前言.....	1
貳、文獻回顧.....	2
一、骨骼組成與代謝.....	2
二、骨質疏鬆症介紹.....	4
三、骨質疏鬆成因及治療方式.....	7
四、鈣之生理功能.....	9
五、大豆蛋白及其水解物之應用.....	11
六、研究目的及動機.....	16
參、材料與方法.....	17
一、儀器及藥品.....	17
(一)儀器設備.....	17
(二)藥品試劑.....	17
(三)酵素免疫分析套組.....	18

(四)動物實驗材料.....	18
二、實驗方法.....	20
(一)實驗設計.....	20
(二)大豆蛋白水解物製備.....	23
(三)動物試驗設計.....	23
1. 實驗動物飼養.....	23
2. 實驗動物分組.....	24
3. 卵巢切除小鼠誘導骨質疏鬆模式之建立.....	24
4. 實驗動物檢體處理與分析.....	25
5. 血清檢體分析.....	26
6. 小鼠股骨之骨小樑測定.....	28
三、統計分析.....	29
肆、結果與討論.....	30
一、口服鈣對健康小鼠(CON)及 OVX 小鼠之影響.....	30
(一)口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠體重、攝食量及臟器相對重量之 影響.....	30
(二)口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠血清生化指數之影響.....	31
(三)口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠肝、腎組織之影響.....	35

(四) 微電腦斷層掃描分析評估口服鈣 CON 及 OVX 小鼠骨小樑 之影響.....	39
二、大豆蛋白水解物(IH)及合成胜肽(NL)對 OVX 小鼠之影響.....	40
(一) 餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠體重、攝食量及臟器相 對重量之影響.....	40
(二) 餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠血清生化指數之影 響.....	46
(三) 餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠肝、腎組織之影響....	50
(四) 微電腦斷層掃描分析評估 IH 及 NL 對 OVX 小鼠骨小樑改 善之影響.....	54
伍、結論.....	61
陸、參考文獻.....	63
柒、附錄.....	73

圖目錄

圖一、骨頭顯微解剖圖	5
圖二、骨重塑循環.....	6
圖三、不同分子量限值濾膜區分 T-ISPH8h 對其區分物鈣整合增量之影響.....	19
圖四、試驗設計.....	21
圖五、試驗期間口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠平均體重之影響.....	32
圖六、試驗期間口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠平均攝食量之影響.....	33
圖七、口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠肝臟 H&E 組織切片染色影響.....	37
圖八、口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠腎臟 H&E 組織切片染色影響.....	38
圖九、口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠骨小樑結構 BV/TV 及 Tb.Th 之影響.....	41
圖十、口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠骨小樑結構 Tb.N 及 Conn.Dn 之影響.....	42
圖十一、口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠骨小樑結構 Tb.Sp 及 Tb.Pf 之影響.....	43
圖十二、口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠骨小樑結構 SMI 及 DA 之影響.....	44
圖十三、3D 微電腦斷層掃描分析口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠股骨骨質之影響.....	45
圖十四、試驗期間餵食不同劑量之大豆蛋白水解物(IH)及合成胜肽(NL)對 OVX 小鼠平均體重之影響.....	47

圖十五、試驗期間餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠平均攝食量之影響...	48
圖十六、餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠肝臟 H&E 組織切片染色之影響.....	52
圖十七、餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠腎臟 H&E 組織切片染色之影響.....	53
圖十八、餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠骨小樑結構 BV/TV 及 Tb.Th 之影響.....	56
圖十九、餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠骨小樑結構 Tb.N 及 Conn.Dn 之影響.....	57
圖二十、餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠骨小樑結構 Tb.Sp 及 Tb.Pf 之影響.....	58
圖二十一、餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠骨小樑結構 SMI 及 DA 之影響.....	59
圖二十二、3D 微電腦斷層掃描分析不同劑量 IH 及 NL 合成胜肽對 OVX 小鼠股骨骨質之影響.....	60

表目錄

表一、口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠臟器及股骨相對重量之影響.....	34
表二、口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠之血清中肝腎功能、鈣、磷及骨鈣素含量 影響.....	36
表三、餵食不同劑量 IH 與 NL 對 OVX 小鼠臟器及股骨相對重量之影響.....	49
表四、餵食不同劑量 IH 與 NL 對 OVX 小鼠血清中肝腎功能、鈣、磷及骨鈣 素含量之影響.....	51



摘要

本研究室先前研究成果指出以 Trypsin 水解分離大豆蛋白，所得到水解物(Isolated soy protein hydrolysate; IH)具有促鈣吸收之作用，從其分離出胜肽序列為 NLQGENEEEDSGAIVTVK (NL)，故本研究將探討 NL 體內促鈣吸收的功能；首先探討口服鈣對於控制組小鼠(CON)及卵巢切除誘導骨質疏松(OVX)小鼠骨質影響，結果顯示 OVX 小鼠骨小樑骨體積比 (Bone volume / Tissue volume ; BV/TV) 及骨小樑數目(Trabecular number ; Tb.N) 顯著低於健康小鼠，而骨小樑分離度(Trabecular separation ; Tb.Sp)顯著上升($p < 0.05$)，在口服碳酸鈣 8 週後 BV/TV、Tb.N 及 Tb.Sp 並無顯著改善效果，健康小鼠骨小樑以桿狀為主，因此骨小樑模式因子(Trabecular bone pattern factor ; TB.Pf)及結構模型指數(Structure model index ; SMI)結果中 CON 組數值顯著高於其他組別。其次為添加不同劑量水解物 IH 及 NL 對 OVX 小鼠骨質影響，探討其對於骨質疏松症改善作用。將小鼠隨機分成 10 組，每組 8 隻包含卵巢切除處理組(OVX)、OVX 加鈣組(OVX+ CaCO₃ ; OC)、未水解 ISP 200 mg/kg 加鈣組(ISP+ CaCO₃ ; ISPC)、低劑量 100 mg/kg IH 加鈣組(LIH+ CaCO₃ ; LIHC)、中劑量 200 mg/kg IH 加鈣組(MIH+ CaCO₃ ; MIHC)、高劑量 400 mg/kg IH 加鈣組(HIH+ CaCO₃ ; HIHC)、低劑量 50 mg/kg NL 加鈣組(LNL+ CaCO₃ ; LNLC)、中劑量 100 mg/kg NL 加鈣組(MNL+ CaCO₃ ;

MNLC)及高劑量 200 mg/kg NL 加鈣組(HNL+ CaCO₃ ; HNLC)及對照組酪蛋白磷酸胜肽 200 mg/kg 加鈣組 (CPP+ CaCO₃ ; CPPC)。結果表示餵食不同劑量 IH 及 NL 後，LNLC、MNLC、HNLC 可顯著提升 BV/TV，MNLC 對於增加骨小樑數目有最佳效果，LNLC、MNLC 及低中高劑量 IHC 均可有效降低骨小樑之間距離($p < 0.05$)，其結果與正控制組 CPPC 相比無顯著差異，表示樣品與 CPPC 之間具有相同效果，其中又以 MNLC 具有最佳改善骨質疏鬆之效果。綜合上述結果，單純口服碳酸鈣對於骨質疏鬆症小鼠骨質並無顯著改善效果，表示碳酸鈣對骨質改善效果有限，在餵食不同劑量大豆蛋白水解物及其區分物 NL 合成胜肽後，可以促進小鼠體內鈣之吸收，有效增加骨小樑數目及縮短骨小樑之間距離，大豆蛋白水解物具有改善因更年期而引起骨質疏鬆症的保健食品開發潛力。

關鍵字：胜肽、大豆蛋白、骨質疏鬆、鈣

Abstract

In previous studies from our lab it was demonstrated that hydrolysis of isolated soy protein (ISP) produced ISP hydrolysate (IH) with calcium-absorption stimulating (CAS) activity. The CAS peptide was identified as NLQGENEEEDS-GAIVTVK (NL). Therefore, in this study ameliorating effect of NL on osteoporosis was investigated in ovariectomized (OVX) mice. The first part was to compare oral calcium for healthy mice (CON) and OVX mice on trabecular parameter. The results showed that trabecular bone volume (Bone volume/Tissue volume; BV/TV) and trabecular number (Trabecular number; Tb.N) of OVX mice were significantly lower than those of CON group, whereas trabecular separation (Trabecular separation; Tb.Sp) significantly increased than CON group ($p < 0.05$). BV/TV, Tb.N and Tb.Sp did not significantly improve after 8 weeks of oral calcium carbonate. The bone structure of CON group was mainly rod-shaped. Trabecular bone pattern factor (TB.Pf) and structure model index (SMI) values of CON group were significantly higher than those of other groups. The second part was to explore the effects of different doses of hydrolysate IH and NL on trabecular parameter of OVX mice. The mice were randomly divided into 10 groups, including ovariectomy group (OVX), OVX with calcium group (OVX+ CaCO₃; OC), unhydrolyzed ISP 200 mg/kg with calcium group (ISP+ CaCO₃; ISPC), low dose 100 mg/kg IH with calcium group (LIH+ CaCO₃; LIHC), medium dose 200 mg/kg IH with calcium group (MIH+ CaCO₃; MIHC), high dose 400 mg/kg IH with calcium group (HIH+CaCO₃; HIHC), low dose 50 mg/kg NL with calcium group (LNL+ CaCO₃; LNLC), medium dose 100 mg/kg NL with calcium group (MNL+ CaCO₃; MNLC) and high dose 200 mg/kg NL with

calcium group (HNL+ CaCO₃; HNLC) and the casein phosphopeptide peptide 200 mg/kg with calcium group (CPP+ CaCO₃; CPPC). The results indicated that BV/TV was significantly improved after oral LNLC, MNLC and HNLC. The distance between trabecular bone was significantly reduced after oral any dosage of IHC, LNLC and MNLC, respectively, which compare to positive control CPPC. Among them, MNLC showed the highest ameliorating effect on osteoporosis. Based on the above results, only oral calcium carbonate had no significant improving effect on bone quality of osteoporosis mice, indicating that calcium carbonate had limited effect on bone quality. However, oral different dosage of IH and NL combined with calcium could promote absorption of calcium, effectively increase Tb.N and decrease Tb.Sp. Soy protein hydrolysate showed the potential to apply in the development of health food for osteoporosis after menopause.

Key word: Peptide, soy protein, osteoporosis, calcium

壹、前言

鈣是人體中含量最豐富的無機元素，佔人體總體重約 1.5 -2.2 %，鈣對人體之主要功能為促進細胞代謝、骨骼生長、幫助凝血、負責神經傳導及控制肌肉收縮等(Bass & Chan, 2006)。鈣質的缺乏可能會導致佝僂症、軟骨病、高血壓及骨質疏鬆症等疾病(Weaver *et al.*, 2002)。骨質疏鬆症被歸於慢性疾病，隨著人類壽命的延長，其罹患率日益增加，當骨骼發育完全後，骨質流失速度平均以每年 1~2% 流失，女性流失速度相較男性更快，婦女在更年期後因體內雌激素減少會使得骨質流失速度增加至 3~5% (Kanis *et al.*, 2013)。

身體主要吸收鈣的部位為小腸的十二指腸和空腸，而食物中如植酸鹽、纖維素、脂肪等成分會減少鈣的溶解度(Jin *et al.*, 2011)。目前市面上常見的鈣離子補充劑有碳酸鈣、乳酸鈣及葡萄糖酸鈣等，因容易在小腸的鹼性環境下形成沉澱，進而降低其生物可利用率(Vavrusova *et al.*, 2014)。有學者利用，如魚皮(Guo *et al.*, 2015)、雞蛋黃(Jiang & Mine, 2000)、磷蝦(Huang *et al.*, 2011)及牛奶中的酪蛋白(Recio *et al.*, 2019)等蛋白質，進行水解後所得到的水解產物與鈣進行螯合，做為鈣離子補充劑之替代品，酪蛋白水解產物之中酪蛋白磷酸胜肽被認為具有良好的促鈣吸收效果，亦有研究指出鈣和胜肽易形成複合物且在小腸的鹼性環境下有良好的可溶性(Perego *et al.*, 2015)。

本研究接續先前研究室利用 Trypsin 對大豆蛋白進行水解得到最佳鈣螯合能力大豆蛋白水解物(Isolated soy protein hydrolysate ; IH)，並將其區分物利用高效液相層析法(Reverse phase)及固定化金屬離子親合層析法(Immobilized metal affinity chromatography; IMAC)進行篩選，再以高效液相層析串聯質譜儀將區分後的物質進行胜肽序列鑑定，所鑑定出之胜肽序列為 NLQGENEEEDSGAIVTVK (NL)，此片段胜肽具有最佳鈣螯合能力，其

鈣螯合量為 4.19 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白質(周，2018)，並利用 Caco-2 及 HT-29 細胞模擬人類腸胃道進行體外試驗，在低鈣和高鈣濃度下，濃度為 50 ppm 之 NL 可顯著促進上述兩種細胞之鈣離子吸收力(施，2018)，因此本研究利用雙側卵巢切除之雌性 C57BL/6J 小鼠模擬更年期婦女之骨質疏鬆症模式，探討 IH 及其區分物 NL 合成胜肽結合碳酸鈣對於小鼠更年期骨質疏鬆症之改善功效。

貳、文獻回顧

一、骨骼組成與代謝

人體骨骼是由兩種不同類型的骨質所組成的(圖一)，分別為緻密骨(Compact bone)及海綿骨(Spongy bone)。其中約有80%都是緻密骨，其特徵較為密集且表面積小，在骨髓腔周圍形成一個封筒形狀稱為哈維氏系統(Haversian system)，由同心圓的骨頭薄片所形成的，中心圍繞著血管的組織；海綿骨亦稱為鬆質骨，相較於緻密骨來說密度小且表面積大，是由許多骨小樑(Trabecular)的骨質互相交織而成。海綿骨分布於長骨的兩端、扁骨的內部及椎骨的內部，緻密骨則是分布於長骨及股骨頸的中心(Ralston, 2017)。海綿骨是由許多桿狀和板狀結構的骨小樑所交織而成的網狀結構，結構良好的骨小樑可有效的支撐骨骼和分散關節承重的負擔，隨著年齡的增長骨小樑骨質量會慢慢流失，主要是因為骨小樑會從板狀結構變薄變細而逐漸轉為桿狀結構，使骨小樑間之距離及骨小樑的異向性程度(Degree of anisotropy; DA)指數增加，這是因為橫軸骨小樑會優先進行骨的再吸收，導致骨小樑的剛度和強度降低，使骨質量減少(Barak *et al.*, 2017)。骨小樑參數可準確預測骨小樑組織的結構性質，以骨小樑體積比(Bone Volume/Tissue Volume ;

BV/TV)、平均骨小樑厚度(Mean trabecular thickness; Tb.Th)、骨小樑數目(Trabecular number; Tb.N)、骨小樑分離度(Trabecular separation; Tb.Sp)、骨小樑模式因子(Trabecular bone pattern factor; TB.Pf)、結構模型指數(Structure model index; SMI)、骨異向性程度(Degree of anisotropy; DA)及骨小樑連接密度(Connectivity density; Conn. Dn)為主要參數(Maquer *et al.*, 2015)。

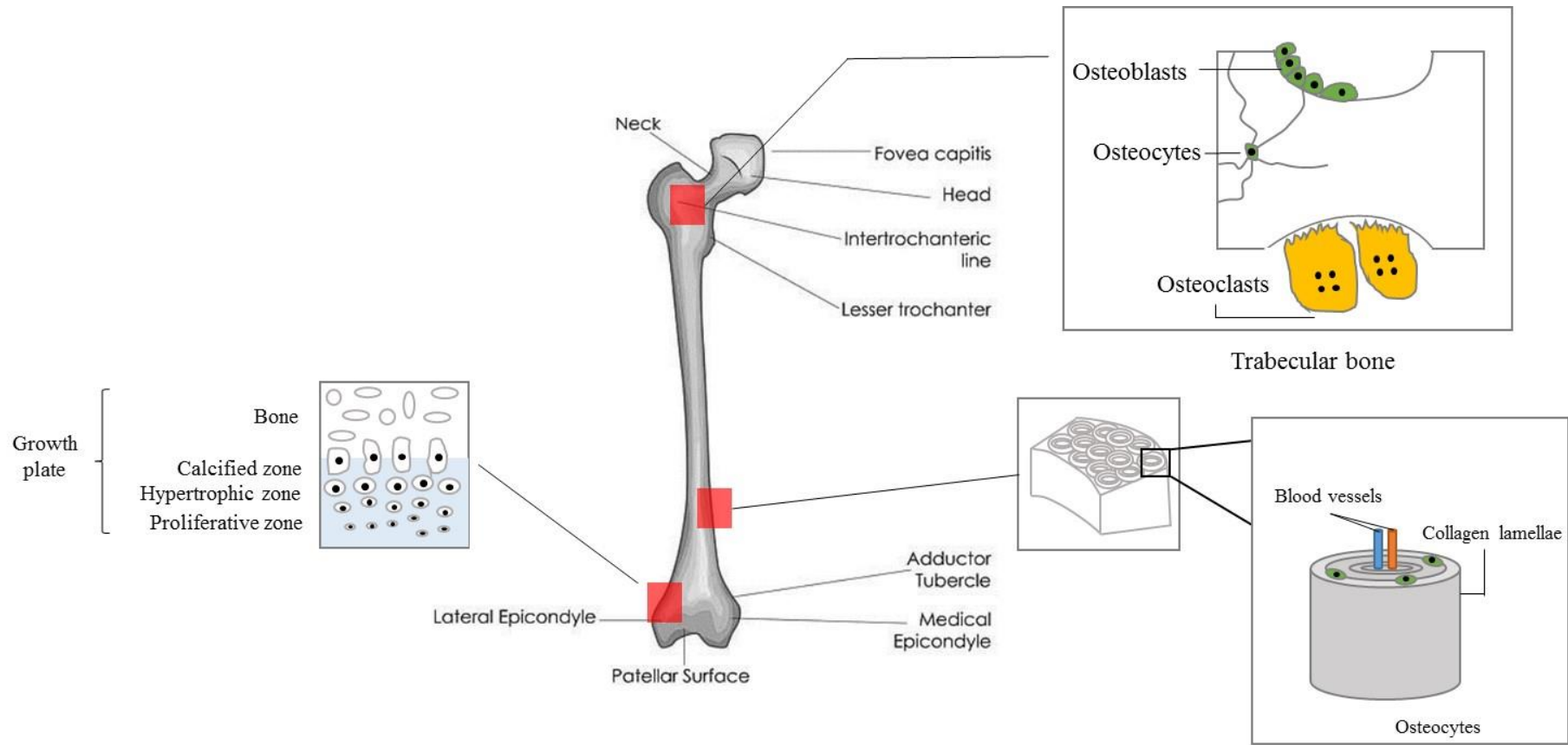
骨骼是一個動態器官，會一直不斷的被破壞及修復，這個反覆的循環稱為骨重塑(Bone remodeling)(圖二)，成年人的骨骼約有10%是處於骨重塑的狀態中，骨重塑是由兩種主要的骨細胞進行調節，分別為成骨細胞(Osteoblasts)及破骨細胞(Osteoclasts) (Mizoguchi *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014)。成骨細胞負責骨基質的合成、分泌及骨礦化，並在骨組織表面上進行造骨作用(Bone formation)形成新生的骨組織，大多數的成骨細胞分化後會成為骨細胞(Osteocyte)，一旦分化成骨細胞後，會開始分泌第一型膠原蛋白、鹼性磷酸酶及骨鈣素等物質，這三者是參與骨礦化的物質。破骨細胞會對老舊的骨組織進行蝕骨作用(Bone resorption)，重塑不平衡會導致疾病的產生，如佝僂症(Rickets)、軟骨症(Osteomalacia)、骨硬化症(Osteosclerosis)及骨質疏鬆症(Osteoporosis)等疾病 (Dallas *et al.*, 2013)。破骨細胞是由造血幹細胞分化而來，其呈現型態是有波浪狀的邊，並有破壞礦化骨的能力，破骨細胞會形成特化細胞附著在老舊的骨組織表面進行侵蝕，稱為蝕骨作用(Faccio *et al.*, 2003)。目前對於誘發破骨細胞重塑的機制尚不清楚，一般認為老舊受損的骨頭會釋放趨化因子進而吸引破骨細胞對骨組織進行蝕骨作用(Ralston, 2017)。骨重塑過程涉及一系列不同種類的細胞，稱為基本多細胞單位(Basic multicellular unit; BMU)，在海綿骨重塑過程中，BMU會沿著骨頭表面行進並進行擴散，而在緻密骨重塑過程中，BMU會在骨頭邊緣進行切割使末端

形成新的骨頭，每個BMU會以同樣的順序執行功能，包括BMU細胞的分化、破骨細胞的激活、成骨細胞的聚集、老舊骨質的再吸收及形成新的骨基質(Ott, 2004)。

二、 骨質疏鬆症介紹

世界聯合國衛生組織(World Health Organization ; WHO)將骨質疏鬆症(Osteoporosis)定義為一種全身骨骼疾病，其特徵包括骨質量減少，骨組織的顯微結構變差，導致骨骼脆弱骨折危險性增高。目前臨床實驗尚未能測定骨骼品質，因此主要根據骨密度測量值來診斷骨質疏鬆症。骨質疏鬆症好發於老年人及更年期後婦女，是影響公眾健康的重要威脅之一，患病後幾乎沒有任何症狀所以難以發現，如今隨著醫療進步及經濟的繁榮，世界人口平均壽命大幅延長，因此骨質疏鬆罹患率亦逐年上升(Kanis *et al.*, 2008)。根據內政部統計台灣自 1993 年起 65 歲以上老年人口比率已經超過百分之七，符合 WHO 對於高齡化國家的定義，且在 2018 年 3 月底時比率上升到 14.05%，因老年人身體狀況較差，使得許多疾病的患病率大幅的提升(內政部, 2018)。WHO 在 1994 年公布骨質疏鬆的判定標準，標準診斷工具為雙能量 X 射線吸收測定法(Dual energy x-ray absorptiometry ; DEXA)，並計算 T 分數(T-Score)，計算方式為骨密度(Bone mineral density ; BMD)值減去 20-29 歲年輕人平均值所得的差值，此差值再除以 20-29 歲年輕人 BMD 之標準差，健康的骨骼 T 分數約在+1 到-1 之間，骨質流失但未評斷為骨質疏鬆其 T 分數為-2.5 到-1 之間，骨質疏鬆症 T 分數則是小於或等於-2.5 (楊等，2008)。

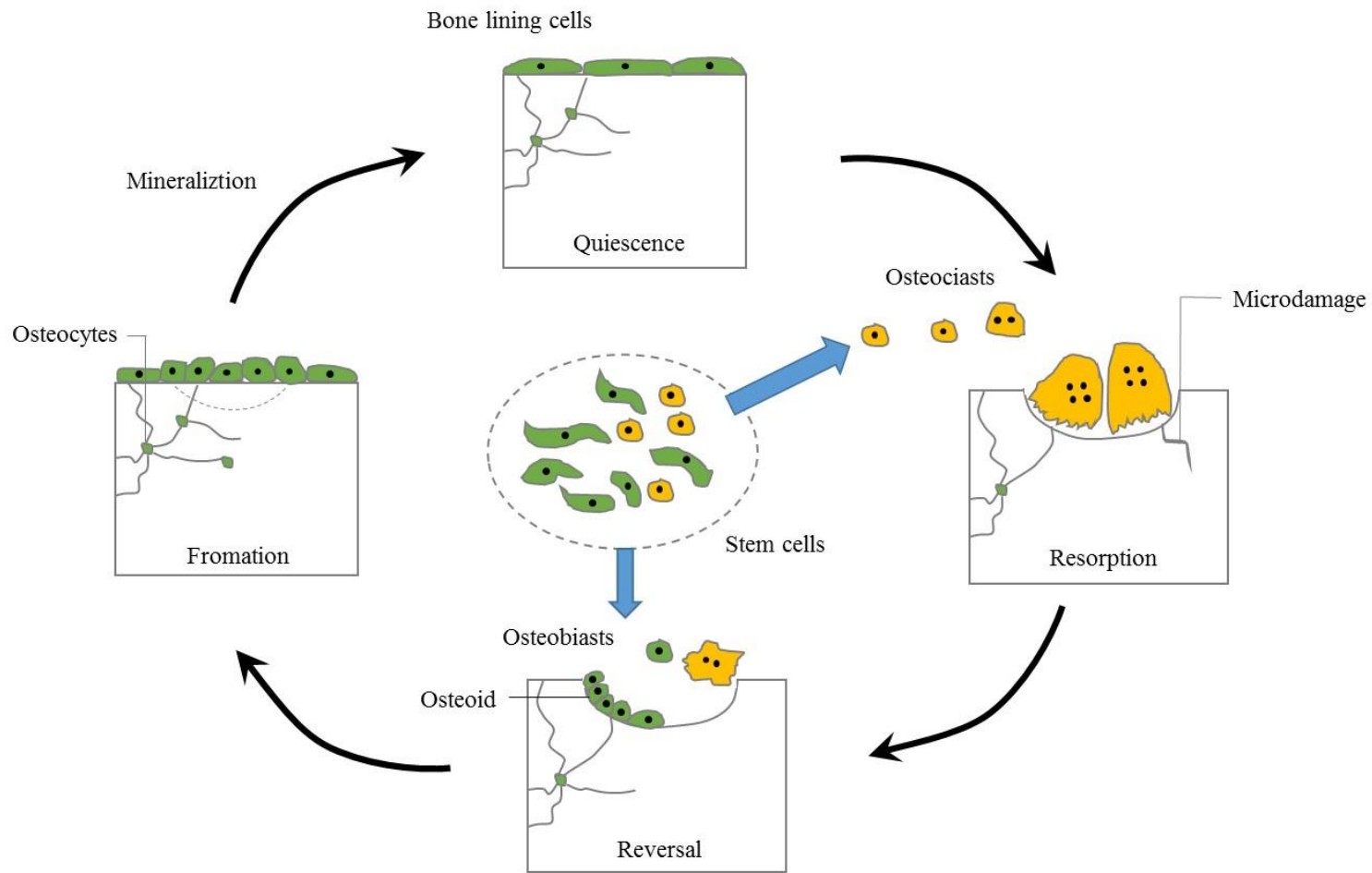
女性比男性更容易罹患骨質疏鬆症且患病機率在更年期後顯著增加，以美國和歐洲為例，約30%更年期後婦女患有骨質疏鬆症，其中40%以上



圖一、骨頭顯微解剖圖

(Ralston, 2017)

Figure 1. Anatomy and microanatomy of bone.



圖二、骨重塑循環

(Ralston, 2017)

Fig 2. Bone remodeling cycle.

曾經有過骨折的經歷，有一項針對美國骨質疏鬆症患病率的研究結果推測，到2020年時，50歲以上骨質疏鬆症或低骨量的人數將從2010年4500萬人次成長到6440萬人次，到2030年時，數字則會增加到7120萬人次，比2010年增加了29%，預計骨折的人數亦會按比例成長(Wright *et al.*, 2014)。根據衛生福利部國民健康署(National nutrition and health survey)的2013-2016年國民營養健康狀況變遷調查顯示，有1733位50歲以上民眾經骨密度檢測，在腰椎及股骨頸至少一部位患有骨質疏鬆的比例約為9.3%，其中男性是6.2%女性則為12%，女性相對男性狀況較為嚴重。台灣是亞洲國家中髖部骨折發病率最高的國家，亦高於世界的平均值，雖然更年期後婦女相較於其他人的骨質疏鬆症具有更高的風險，但骨質流失的情況早在35歲就已經開始了，估計女性到40歲時每年骨質流失率約為1%，因此各年齡層女性都應更加注意骨質疏鬆症的發生(Ja *et al.*, 2012)。

三、 骨質疏鬆成因及治療方式

(一)骨質疏鬆成因

骨質疏鬆症是一種內在和外在環境因素影響的代謝性骨骼疾病，亦是一種多病源性疾病，該疾病使用 DEXA 測定髖部或脊椎之 BMD，患病後主要特徵在於 BMD 降低，其成因是在骨重建的過程中引發的，當體內的破骨細胞所引起的骨吸收超過成骨細胞的骨形成時，就會引發不平衡的狀態，因為骨小樑具有較大表面積和體積，這種不平衡對於骨小樑有最大的影響(Chappard *et al.*, 2008; Parfitt, 2002; Wark, 1996)。現代人隨著平均壽命不斷的增加，亦引起了骨質疏鬆症的患病率增加，間接的使更多人因患有骨質疏鬆症而導致骨折(Boonen *et al.*, 2008)。

根據研究統計，在全世界約有超過 2 億人有骨質疏鬆症，以女性而言，60-70 歲有 70 % 的比例患有骨質疏鬆症，其中曾發生骨折的比例有 20 %，80-90 歲以上有 40 %，90 歲以上有 67 %，預計到 2050 年時女性及男性髖部骨折的發病率分別會增加 240 % 和 310 % (Chen *et al.*, 2018)。骨質疏鬆的成因包括衰老、性別、身體激素、飲食、行為習慣、遺傳及生殖哺乳 (Brickley *et al.*, 2010; Dede *et al.*, 2018; Golob *et al.*, 2015)，目前認為衰老是引起骨質疏鬆症的最主要危險因素，原因為成骨細胞活性降低以及飲食中的一些食物成分會影響腸道中的鈣吸收 (Curate, 2014; Madimenos, 2015; Recker *et al.*, 2004)。除了年齡增長的衰老外，女性的雌激素缺乏亦是引起骨質疏鬆的高危險因子之一，雌激素缺乏會導致更年期後婦女的骨質疏鬆症 (Seeman, 2003)。在動物實驗中誘發骨質疏鬆症最常見的方法是雙側卵巢切除手術 (Ovariectomized; OVX)，雌激素缺乏會直接對成骨細胞和破骨細胞造成影響，誘導骨質流失因而影響骨重塑過程 (Klein-Nulend *et al.*, 2015)。這種因更年期而導致骨質疏鬆的骨質流失非常的快速，由於雌激素與調節骨吸收和骨形成之間的平衡有關。

(二) 骨質疏鬆治療方式

目前醫學上主要的骨質疏鬆症治療方式為雌激素治療及雙磷酸鹽類藥物治療，然而這些治療方法對於人體可能會產生副作用，當長時間暴露於雌激素治療之下可能會增加乳腺癌、心血管疾病及血脂異常等疾病風險 (Chen *et al.*, 2014)。雙磷酸鹽類藥物包含福善美 (Alendronate)、安妥良 (Risedronate) 骨維壯 (Ibandronate) 等，這類藥物可以有效抑制破骨細胞作用減緩骨質流失，但其副作用包括噁心、嘔吐骨疼痛、頷骨壞死及非典型股骨骨折 (Villiers *et al.*, 2012; Khosla *et al.*, 2012)，目前醫療上仍然缺乏一個可靠的治療方式。

許多研究顯示，水果中的某些營養素例如益生質和礦物質可以有效的使骨質疏鬆症患者增加 BMD，藉由適當的營養攝取可以預防和治療骨質疏鬆症，副作用亦比藥物治療來的少。益生質是食物成分在小腸中不被吸收或消化，但在大腸中可被有益菌利用且有助其生長。如菊粉、低聚半乳糖及低聚果糖，均有研究指出可以改善骨骼健康(Stránský *et al.*, 2009)。腸道中的微生物會將益生質代謝為短鏈脂肪酸，可增加腸道中鈣的吸收，此外丁酸亦是屬於一類抗骨質疏鬆藥物，可用於治療骨質流失(Katono *et al.*, 2008)。

四、鈣之生理功能

鈣 (Calcium ; Ca) 是人體中含量最豐富的礦物質，對維持人類生命具有重要功用，人體內約含有 1000 g 的鈣，有 99 % 是以磷酸鈣的方式存在於人體骨骼內，與骨骼的剛硬程度有關係，另外 1 % 則是負責調節血液中鈣離子濃度穩定及負責調節細胞分化等功能(Zhou *et al.*, 2013)。鈣離子在人體中負責了許多重要的作用，例如控制肌肉收縮、幫助酵素活化及負責細胞分化凋亡等功能(Chen *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2013)。目前已知鈣是負責信號傳導的第二信使，並且是生物體內維持正常生理功能不可或缺的一部份，鈣攝取量不足會導致骨骼產生某些代謝疾病，並使鈣的生物可利用率降低，因而對骨量及身體健康造成許多負面的影響(Suzuki *et al.*, 2008)。人體在成長過程中需要更多的鈣質補充，青春期後隨著年齡的增長鈣質需求則會逐漸降低，婦女則在懷孕和哺乳期間鈣的需求會增加，女性在 55-60 歲及男性 60-65 歲之間對於鈣的吸收程度會降低，在 80 歲之後因為胃酸分泌較少而降低鈣鹽的溶解度，造成鈣在腸道中沉澱進而降低人體對鈣的吸收率，因此與其他年齡層相比鈣吸收不良更顯著(Mesias *et al.*, 2011)。

鈣為組成身體骨骼及牙齒的主要成分，若鈣質攝取量不足，長期下來對兒童或青少年易導致骨骼成長不良、成年人或長者易發生骨質疏鬆症，因此更應該注意鈣質的攝取，台灣衛生福利部建議 7-9 歲兒童每日鈣攝取量為 800 mg、10-12 歲為 1000 mg、13-18 歲為 1200 mg，成年人則為 1000 mg，鈣攝取不足可能會導致如骨質疏鬆症、骨質減少甚至是高血壓等疾病 (Adluri *et al.*, 2010; Centeno *et al.*, 2009; Moseley *et al.*, 2011)。缺乏鈣會使蝕骨作用增加(Bone resorption)並減少骨質量因而導致佝僂症及骨質疏鬆症 (Guéguen *et al.*, 2000; Weaver *et al.*, 2002)。牛奶及乳製品這類食物含有豐富的鈣含量，不僅是乳製品，許多綠色蔬菜和一些果乾類亦含有鈣質，除了因為內在的原因導致鈣吸收不佳，例如胃酸分泌減少，亦有可能因為外在的因素降低鈣在人體的吸收率，例如某些食物成分可能會因在胃酸中溶解度不高，則這些微溶性的物質會對鈣吸收產生負面的影響(Guéguen & Pointillart, 2000)。穀物中含有的植酸會和金屬離子進行結合，並阻止礦物質例如鈣、鋅、鎂的吸收(Vavrusova & Skibsted, 2014)。中藥材大黃和菠菜中高濃度的草酸鹽，亦有研究發現會和鈣結合形成草酸鈣，並降低鈣的生物可利用性 (Weaver *et al.*, 1987)。市面上最常見的鈣離子補充劑形式為離子鈣，例如碳酸鈣、乳酸鈣、葡萄糖酸鈣，然而離子鈣的缺點是他在腸道的鹼性環境下容易使鈣沉澱，導致鈣的吸收率下降及生物可利用性嚴重降低。此外過量攝取碳酸鈣可能會導致腸胃道產生不適，例如便秘以及氣體的產生導致胃脹氣、腹脹腹痛等副作用(Chen *et al.*, 2014)。

攝取足夠的鈣被認為是預防骨質疏鬆症最好的方法，為了使攝取進去的鈣被人體吸收，這些鈣必須先在胃酸中溶解，或者是以溶解的狀態被攝取 (Guéguen & Pointillart, 2000)。人體中主要吸收鈣的部份在小腸，有 90 % 的

鈣會被小腸所吸收，鈣會以可溶性離子(Ca^{2+})的形式和可溶性的有機分子結合並進入腸壁之中，其餘的則會由胃及結腸吸收(Wasserman, 2004)。人體腸道為鹼性環境，鈣在鹼性環境中易與食物中的植酸結合形成不溶性鈣鹽，使鈣沉澱並降低生物可利用率(Jin *et al.*, 2011)。鈣的生物可利用率很低，有研究指出利用食物蛋白質作為原料進行水解所得到之胜肽與鈣進行螯合可以有效促進鈣在人體的吸收率，因此如何利用胜肽與鈣進行螯合以提升鈣生物可利用率為現今主要之研究課題(Narin *et al.*, 2013)。

五、大豆蛋白及其水解物之應用

(一)大豆蛋白

大豆蛋白為食品工業中大豆油製造後的副產物，經由粉碎或擠壓並進行適當的熱處理製成的，大多數都被拿來應用於食品添加物或動物飼料之中。目前市面上有三種不同的商業大豆產物，分別有大豆粉(Soy flour; SF)、大豆濃縮蛋白(Soy protein concentrate; SPC)及大豆分離蛋白(Soy protein isolate; ISP)。SF 是大豆經由研磨成細粉而成的，約有 50%的蛋白質含量，SPC 是將脫脂大豆去除部分的碳水化合物所製成的，ISP 是一種精緻純化後的大豆蛋白，其蛋白質可達 90% (Hinrichsen *et al.*, 2005)。大豆蛋白由白蛋白和球蛋白所混合組成，其中 90%是球蛋白所組成的，利用超高速離心沉降法分析其組成分，大豆蛋白可分為四大類包括 2S、7S(Beta-conglycinin)、11S(Conglycinin)和 15S(S 為 Svedberg 單位)，其中以 7S 及 11S 為主要兩個部分，各佔大豆蛋白結構中的 35%及 52%，2S 和 15S 各佔了 8%和 5%。大豆蛋白含有 18 個胺基酸，包含極性官能基團的胺基酸，例如羧基、胺基和羥基，因易發生化學反應所以使大豆蛋白具有易修飾的特性(Tian *et al.*,

2018)。大豆濃縮蛋白和大豆蛋白分離物是人類理想中的蛋白質來源，同時亦是良好的膳食鈣來源(Nill, 2016)。有研究發現，去除植酸鹽的脫氫大豆球蛋白其水解物可以增強大鼠體內小腸的鈣吸收(Heaney *et al.*, 1991)。以大豆蛋白為原料進行水解的產物(SPH)可有效促進 Caco-2 cell 的鈣攝取(Ying *et al.*, 2008)。另一項研究結果顯示，SPH 與鈣進行螯合的複合物能幫助成長中動物的增強體內鈣吸收(Lu *et al.*, 2013)。

(二)水解物之應用

隨著世界人口逐年增加，蛋白質消耗量提高，需求亦不斷的增加，目前一直在積極的尋找更好的蛋白質替代來源，在最近幾十年來，植物性蛋白質引起了人們的關注，因為相較於來自動物性蛋白質的生物活性肽，其成本較低且供應量充足，蛋白質是重要的營養素之一，亦是生物體必需胺基酸和能量的來源，除了提供基本營養之外，食物中的蛋白質可藉由體內腸道酵素或體外添加酵素的水解作用，進而釋放某些胺基酸序列的生物活性肽提供生物體額外的健康益處(García *et al.*, 2013)。世界上許多科學家致力於利用蛋白質進行水解，水解有許多好處，例如可改善食物蛋白質營養特性、延遲敗壞、改善結構、增加或降低溶解性等，其中得到的水解產物及生物活性肽可增加某些食品原料之附加價值(趙等, 1997)。一般而言，生物活性肽為寡肽，當存在於在蛋白質分子序列中時往往不具活性，但是可藉由酵素水解、發酵及腸胃道消化進而釋放出來，以人體來說低分子量(molecular weight; MW)的肽比蛋白質更容易被人體消化，並具有更高的生物可利用率(Bhat *et al.*, 2015; Chalamaiah *et al.*, 2012; García *et al.*, 2013; He *et al.*, 2015)。

(三)水解方式

蛋白質水解產物含有許多胺基酸和小分子肽(Meram Chalamaiah *et al.*,

2017)，可以利用化學法和酵素法水解蛋白質而生成；化學法是利用酸或鹼水解蛋白質，雖然簡單廉價，但是由於反應條件劇烈不易控制，生產過程不僅容易使胺基酸嚴重受損，如 L-胺基酸形成 D-胺基酸，而且難以控制其水解程度，因此較少採用(趙等, 1997)。酵素法則是利用具有專一性水解作用的酵素水解蛋白質，不僅反應溫和易控制其水解程度且在營養價值和功能性方面能提供更好的產品，亦不會有化學藥劑殘留，是為最佳的方法(Quaglia *et al.*, 1990)。酵素水解細分成以下三種方法：

1. 自體消化

自體消化是內源性蛋白酶對蛋白質進行切割，產生生物活性肽的功效，蛋白質大部分是來自於海洋生物加工後的副產物，因海洋生物體內具有高含量的內源酶，如胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶等。舉例來說，魷魚(*Ommatrophes bartrami*)內臟經過自體消化後可以生產出具有高抗氧化活性的生物活性肽，自體消化因生產過程中沒有酵素成本所以是最簡單而且經濟的方法，然而自體消化的缺點是可能會因為酵素活性、海洋生物本身的生理條件、pH 值和溫度等影響生產效果(Song *et al.*, 2016)。

2. 微生物發酵

在食品工業中使用了不同的微生物大規模生產生物活性肽，這些微生物例如乳酸菌、芽孢桿菌屬和雙歧桿菌。因這些微生物會產生一些胞內或胞外的蛋白酶，和使用商業酵素的水解反應相比，微生物發酵時間較短，且培養微生物成本較低，然而微生物所生產的生物活性肽其活性受到微生物生長及環境條件所影響，導致反應過程難以控制(Korhonen *et al.*, 2006)。

3. 酵素水解

生產活性肽最常見的方式為直接利用酵素水解蛋白質，因為其反應不

會產生有毒物質亦不容易有有機溶劑的殘留，且容易控制水解條件(Kim *et al.*, 2010)。生產生物活性肽最常用的酵素包括 Alcalase、Trypsin、Pepsin、Flavourzyme 等，因為與蛋白質作用後可以釋放出大量的生物活性肽(Shahidi *et al.*, 2008)，目前亦利用腸胃道消化酵素來模擬蛋白質在人體內的消化作用，並評估消化後所得蛋白質水解物中生物活性肽具有血管收縮素轉化酶抑制作用(Giromini *et al.*, 2017)以及提高鋅、鐵及鈣等礦物質的生物可利用率(Fuentes *et al.*, 2011)。與自體消化相比，酵素水解不僅在反應速度和提高產物質量方面更容易掌握控制條件，亦被認為是一種有效改善蛋白質特性及提高營養價值有效的方式(Chalamaiah *et al.*, 2010)。利用酵素水解和控制反應條件可以有效提升蛋白質質量和功能特性，例溶解度、容油力、保水力、乳化及發泡性能等，酵素水解過程取決於若干因素，包括酵素類型、基質和水解條件，如酵素濃度、溫度、pH 及時間等，這些因素影響酵素活性，使水解過程更加容易控制(Noman *et al.*, 2018)。酵素的專一性水解能在一定的條件下進行，以剪切蛋白質產生特定序列組合的胜肽，水解過程較容易控制條件，並具有高度的專一性，因此能滿足生產胜肽過程的需求，水解反應後產物跟原料蛋白相比，其胺基酸組成具有特殊的機能性與生理功能，更有發展潛力。在生產蛋白水解物中，酵素的選擇是重要的關鍵，不僅影響最後產品的產率、反應速度，亦影響了產品最終的風味和機能性(鄭等, 2002)。

(四)生物活性肽之機能性

近年來，健康與天然活性化合物之間的關係倍受人們關注，在各類活性化合物中，蛋白質胜肽具有很大的意義。胜肽的活性及特異性取決於其胺基酸結構和排序方式，生物活性肽被定義為長度在 2 到 30 個胺基酸之間 (Pan *et al.*, 2012)，多數生物活性肽具有某些生理功能可以改善人體健康(Kitts *et*

al., 2003)，如免疫調節(Bhat *et al.*, 2015)、抗癌、降高血壓、抗氧化、抗發炎、降血脂(Bhat *et al.*, 2015; Chalamaiah *et al.*, 2012; García *et al.*, 2013)等作用，本研究室亦致力於生物活性肽研究，如利用 Pepsin 水解大豆蛋白所得水解物具有免疫調節功能(呂, 2015)、Alcalase 水解馬鈴薯蛋白所得水解物具有促脂解作用(蘇, 2015)及 Alcalase 水解大豆蛋白所得水解物具有調節血糖作用(招, 2016)，生物活性肽可以添加到許多產品或成分中，並做為保健食品(Hartmann *et al.*, 2007)。目前研究最多的蛋白質來源是牛奶、乳清、雞蛋、魚類、大豆、大米、花生、玉米等。除了具有生物活性外，其蛋白質水解物亦具有多種物理化學性質，包括提升溶解度、發泡性及乳化力。這些特性取決於肽的組成、順序和長度(Cho *et al.*, 2014; Pokora *et al.*, 2013)。

將鈣與一些特定物質結合可以有效防止鈣沉澱，例如與蛋白質多肽進行結合(Daengprok *et al.*, 2003)。螯合鈣目前已經被認為可以有效成為離子鈣的替代品，目前離子鈣的兩個主要的缺點為在低濃度下，其吸收率低且生物可利用率低易形成磷酸鈣沉澱，以及在高濃度下對生物體來說具有毒性(Bronner *et al.*, 1999)。利用胺基酸和鈣進行螯合的胺基酸-鈣複合物在消化過程中即使 pH 值變化，還是可以保持可溶性及維持電中性狀態，可以有效增加其吸收率及提高生物可利用率。但是螯合物中的鈣鍵結量有多少，取決於其配體(Liu *et al.*, 2015)。小片段的肽具有多種優點，如能量消耗少、鈣鍵結量高、體內吸收速度快、載體不容易飽和等優點(Rerat *et al.*, 1988)。

蛋白質本身可以促進鈣的吸收，其水解物中所產生的肽亦具有鈣螯合的能力，並且可以增加鈣的吸收和提高生物利用率，如乳清蛋白(Zhao *et al.*, 2014)、大豆蛋白(Lv *et al.*, 2013)、蛤肉蛋白(Flesh of clam)(Wang *et al.*, 2012)、羅非魚肉蛋白(Tilapia protein)(Charoenphun *et al.*, 2013)。根據研究，酪蛋白

磷酸胜肽 (Casein phosphopeptides ; CPPs) 和 卵黃蛋白磷酸肽 (Phosvitin phosphopeptides ; PPPs) 可以增加腸道對鈣的吸收 (Perego *et al.*, 2015) , 其中絲胺酸 (Serine) 的磷酸殘基可與鈣螯合形成可溶性的穩定複合物 (Jiang *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 1986) 。此外, 研究發現沒有磷酸化殘基的大豆胜肽所含 Glu 和 Asp 殘基的羧基可與鈣進行結合 (Bao *et al.*, 2008; Kumagai *et al.*, 2004) , 從魚骨、蝦副產物及乳清蛋白中獲得的胜肽, 在體內及體外實驗中均具有促進鈣吸收的效果 (Huang *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2013) 。

六、 研究目的及動機

目前全球人口暴增且正在步入老年化的社會, 亦因為這樣帶來了許多老年疾病的相關問題, 骨質疏鬆症就是其中之一, 女性天生骨質量就比男性少, 更年期後會發生骨質量大量的流失狀況。市面上的鈣離子補充劑並無法有效的提高鈣的生物可利用率, 且可能會有副作用的產生, 如脹氣、腹瀉及腹痛等 (Sun *et al.*, 2016) 。因此本研究接續了先前從大豆蛋白水解物中區分出體外促鈣吸收肽的研究成果, 進行體內動物試驗的驗證; 該研究使用四種常見酵素 Alcalase、Pepsin、Trypsin、Chymotrypsin 及七種膳食蛋白交叉組合進行水解並篩選出具有促鈣吸收或高鈣螯合率且螯合鈣後可溶於水的水解物或其區分物, 其中以 Trypsin 水解大豆分離蛋白 8 h 之水解物 (T-ISP8h) 有最好的鈣螯合率。再以 30 kDa、10 kDa、1 kDa 不同分子量限值 (Molecular weight cut-off ; MWCO) 濾膜進行區分, 結果以 1 kDa MWCO permeate (1P) 具有最佳的鈣螯合增量, 其鈣螯合可顯著的由約 0.25 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein 增加到 1.83 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein (圖三), 後續再以逆相高效層析 (Reverse phase) 及固定化金屬離子親和層析 (Immobilized metal affinity chromatography) 區分出 RP1、RP2、RP3、IGE2、IGE4、IGE6 及 IIE2, 結果以 RP2 及 IIE2 具有最

佳的結果，其鈣螯合率分別可增加至 2.97 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein 及 3.27 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白質，再利用 LC-MS/MS 對 RP2 及 IIE2 進行胺基酸序列鑑定，確認胺基酸序列為 NLQGENEEEDSGAIVTVK (NL)及 SQRPQDRHQK (SQ)，最後將合成胜肽的片段以模擬腸胃道消化試驗探討鈣螯合增量變化，最終結果顯示 NL 具有最好的鈣螯合增量(周, 2018)。因此本研究進一步以雙側卵巢切除誘導雌性小鼠建立骨質疏鬆模式鼠模擬女性更年期動物試驗評估 NL 對促鈣吸收的影響，並探討促鈣吸收肽 NL 對模式鼠骨鬆改善的效果。

參、材料與方法

一、儀器及藥品

(一)儀器設備

1. 純水製造機(Milli-Q)
2. 水解攪拌反應系統槽購自上展工業有限公司(Taipei, Taiwan)
3. 連續式高速離心分離機(Himac CR22GII , HITACHI, Japan)
4. 冷凍乾燥機(FD2-6P, Kingmech, Taiwan)
5. 電子天秤(HR-202i, A&D, Japan)
6. 恆溫水浴槽(WB212-B1, TKS KANSIN, Taiwan)
7. 微電腦斷層掃描分析系統 Microcomputed tomography SkyScan 1076 (μCT , Skyscan, Kontich, Belgium)

(二)藥品試劑

1. 大豆分離蛋白-26 (Isolated soy protein; ISP)購自裕卜股份有限公司

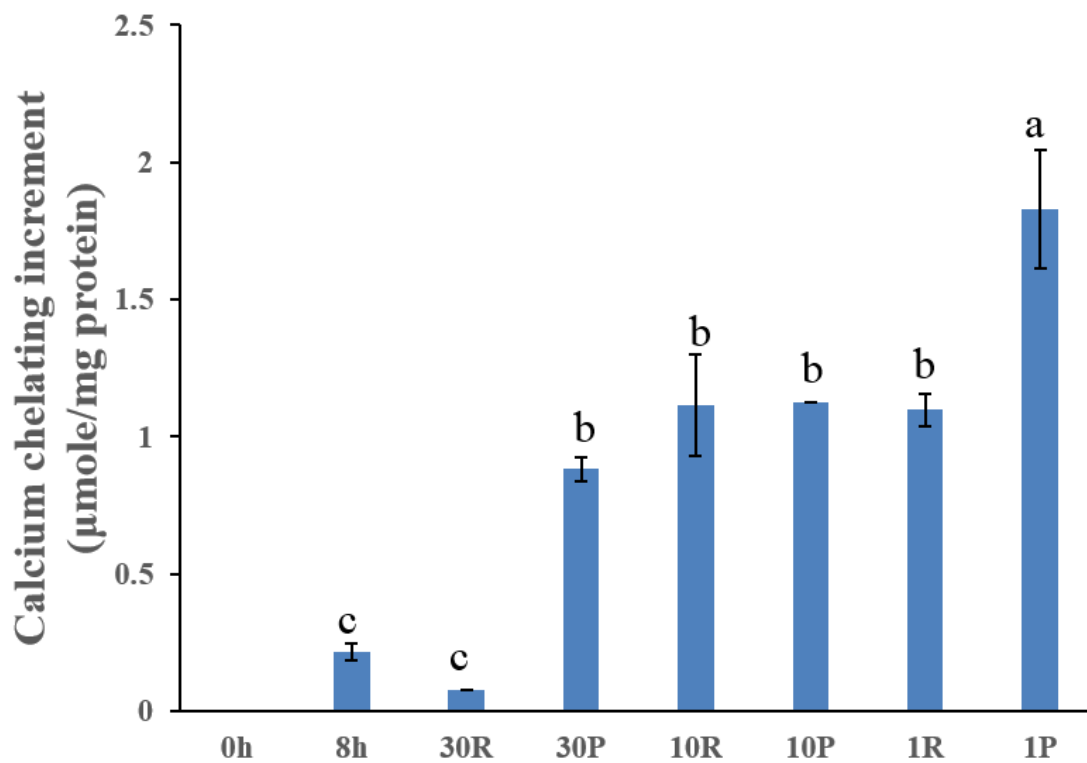
- (Taichung, Taiwan)
2. 酪蛋白磷酸胜肽(Casein phosphate peptide; CPP)購自漢馨科技有限公司
(Taipei, Taiwan)
 3. 碳酸鈣(Calcium carbonate) 購自振芳股份有限公司(Taipei, Taiwan)
 4. NLQGENEEEDSGAIVTVK (NL)合成胜肽片段購自曜鴻生物科技有限
公司(Taipei, Taiwan)
 5. Sodium hydrogen phosphate(Na_2HPO_4)購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)
 6. Trypsin 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)
 7. Avertin 配製:2,2,2 Tribromoethanol 及 Amylene hydrate 皆購自 Sigma (St.
Louis, MO, USA)

(三)酵素免疫分析套組

1. Mouse Osteocalcin ELISA Kit (Cat. No. CSB-E06917m) 購自世盟生物科
技有限公司 (CUSABIO, Baltimore, USA)

(四)動物實驗材料

1. B6小鼠(C57BL/6J)購自國家實驗研究院國家實驗動物中心
(Taipei,Taiwan)
2. 飼料Laboratory rodent diet 5001購自雍立貿易股份有限公司(St. Louis,
MO, USA)
3. 白楊木墊料購自雍立貿易股份有限公司(St. Louis, MO, USA)



圖三、不同分子量限值濾膜區分 T-ISP8h 對其區分物鈣螯合增量之影響

Fig 3. Effect of different molecular weight cut-off (MWCO)

membranes on calcium chelating increment of Trypsin-ISP8h and its fractions obtained from fractionating with different MWCO in membrane reactor system. Bars represent mean \pm SD, $n=3$. Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Tukey's range test. (Chou,2018)

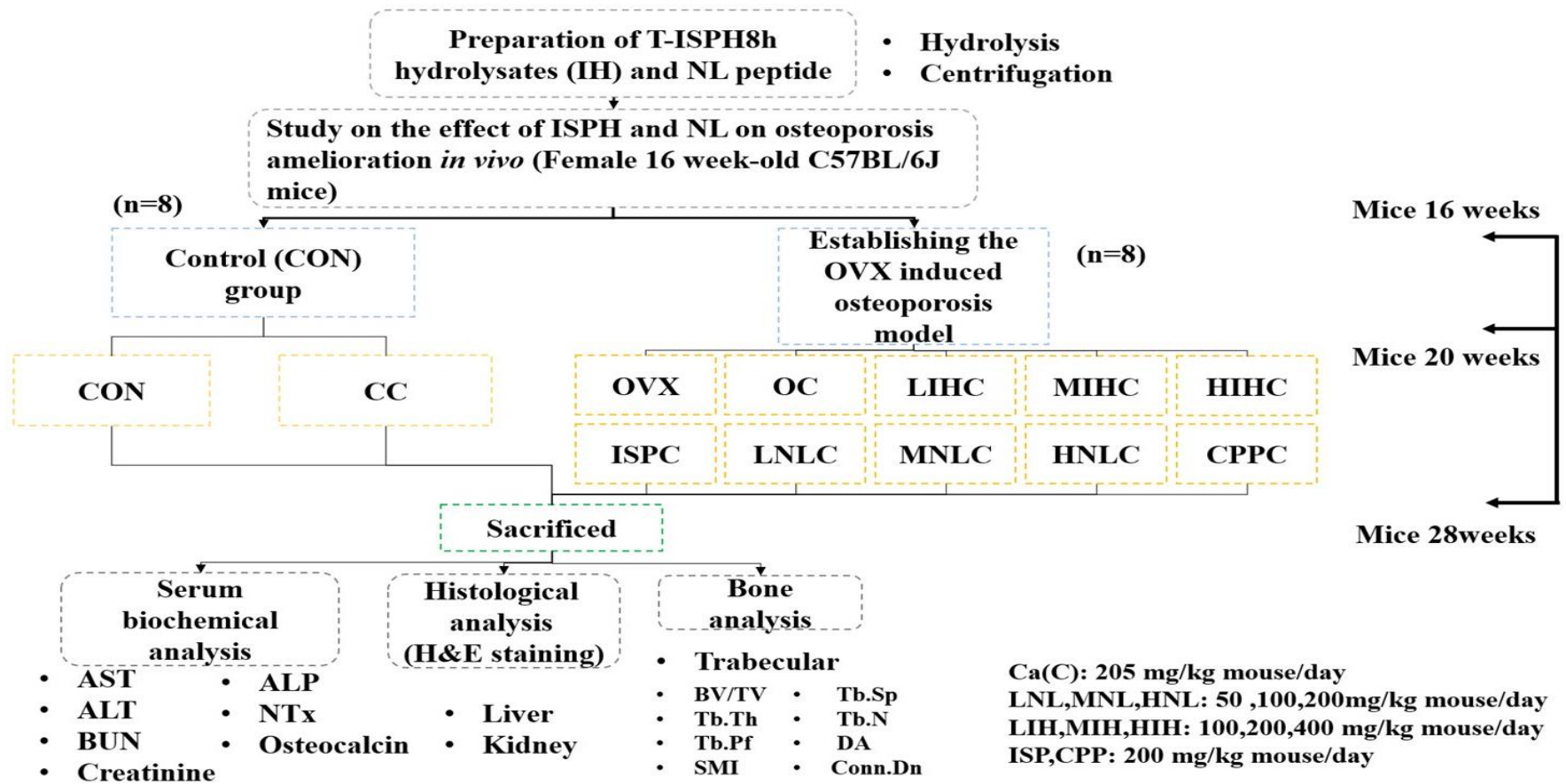
二、實驗方法

(一)實驗設計

本次實驗設計如圖五所示，並分為兩大部分，依據先前研究室研究成果，製備具有促進鈣吸收之胜肽，將 ISP 利用 trypsin 水解並蒐集第 8h 之水解產物，進行離心後將上清液蒐集並凍乾保存即為大豆蛋白水解物 (ISP hydrolysate ; IH)，並將先前所定序出之 NL 片段胜肽委託曜鴻生技公司合成。第二部分則為動物實驗，購買四週齡大之 C57BL/6J 雌性小鼠，飼養至十六週齡待其生長發育完全後，進行雙側卵巢切除手術，經過四個禮拜待其復原後除了餵食 Laboratory 5001 飼料以外開始進行管餵此次試驗樣品 IH 及 NL。

碳酸鈣餵食劑量根據衛福部 60 kg 成人每日鈣攝取建議量為 1000 mg，小鼠及人類代謝率為 3：37，換算後即為 205mg/kg/mouse，樣品 IH 及 NL 劑量參考 Zhao 等人(2014)計算方式並稍做修改，小鼠分組(n=8)及試驗樣品每日管餵劑量與試驗設計如圖五所示，各組管餵劑量如下：

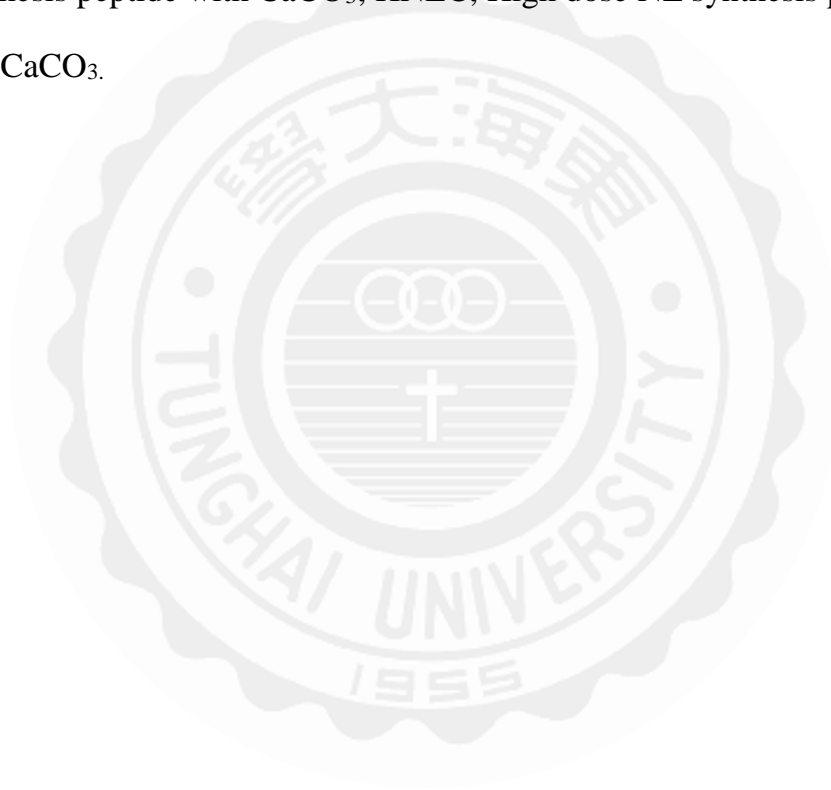
1. Control：滅菌後去離子水(DDW) (0.5 ml/mouse)
2. CC：滅菌後去離子水及碳酸鈣 (205 mg/kg/mouse)
3. OVX：滅菌後去離子水(DDW) (0.5 ml/mouse)
4. OC：滅菌後去離子水及碳酸鈣 (205 mg/kg/mouse)
5. ISPC：分離大豆蛋白粉溶液及碳酸鈣之混合物(200 mg/kg/mouse；205 mg/kg/mouse)
6. LIHC：低劑量大豆蛋白 8h 水解物及碳酸鈣之混合物(100 mg/kg/mouse；205 mg/kg/mouse)



圖四、試驗設計

Fig 4. Experiment design. Abbreviations symbols represent CON, Control group; CC, Control with CaCO₃ group; OVX, Ovariectomy group; OC, Ovariectomy with CaCO₃; ISPC, isolated soy protein with CaCO₃; LIHC, Low dose isolated

soy protein hydrolysates with CaCO₃; MIHC, Medium dose isolated soy protein hydrolysates with CaCO₃; HIHC, High dose isolated soy protein hydrolysates with CaCO₃; LNLC, Low dose NL synthesis peptide with CaCO₃; MNLC, Medium dose NL synthesis peptide with CaCO₃; HNLC, High dose NL synthesis peptide with CaCO₃; CPPC, Casein phosphopeptides with CaCO₃.



7. MIHC: 中劑量大豆蛋白 8h 水解物及碳酸鈣之混合物 (200 mg/kg/mouse ; 205 mg/kg/mouse)
8. HIHC: 高劑量大豆蛋白 8h 白水解物及碳酸鈣之混合物 (400 mg/kg/mouse ; 205 mg/kg/mouse)
9. LNLC : 低劑量合成胜肽片段 NL 及碳酸鈣之混合物(50 mg/kg/mouse ; 205 mg/kg/mouse)
- 10.MNLC: 中劑量合成胜肽片段 NL 及碳酸鈣之混合物 (100 mg/kg/mouse ; 205 mg/kg/mouse)
- 11.HNLC: 高劑量合成胜肽片段 NL 及碳酸鈣之混合物 (200 mg/kg/mouse ; 205mg/kg/mouse)
- 12.CPPC : 酪蛋白磷酸胜肽及碳酸鈣之混合物(200 mg/kg/mouse ; 205 mg/kg/mouse)

(二)大豆蛋白水解物製備

配置0.2 mM 磷酸鹽緩衝溶液，調整至trypsin最適pH 7.5，加入3 % ISP至水解攪拌反應槽內，當溫度到達 50 °C 時加入1 % trypsin進行水解，即酵素基值比為1:100。水解8 h後，再以100 °C沸水浴進行10 min使酵素失活。製備好之水解物進行離心(4 °C、10000 × g、離心15 min)取上清液凍乾備用即為本次研究用樣品(IH)。

(三)動物試驗設計

1. 實驗動物飼養

實驗動物採用四週齡無特定病原 C57BL/6J (B6) 品系之雌性小鼠共144

隻，平均初體重約為 16-17 g。依照平均體重隨機將小鼠分為 12 組，每組 12 隻，四隻小鼠為一籠，將每籠小鼠在耳朵上分別打洞並標記對應號碼以利後續實驗進行。所有小鼠都飼養在 25 ± 2 °C，濕度 60 ± 5 % 之下，12 h 自動控制黑暗及光亮的環境中，基礎飼料及滅菌後無菌水可供自由攝取、飲用，每週記錄動物體重及攝食量。

2. 實驗動物分組

將小鼠依照平均體重隨機分組，共分成 12 組，每組 12 隻包含正控制組(Control; CON)、控制組加鈣組(Control+ CaCO₃ ; CC)、雙側卵巢切除處理組(Ovariectomy; OVX)、雙側卵巢切除處理加鈣組(OVX+ CaCO₃ ; OC)、分離大豆蛋白溶液加鈣組(ISP+ CaCO₃ ; ISPC)、低劑量大豆蛋白水解物加鈣組(LIH+ CaCO₃ ; LIHC)、中劑量大豆蛋白水解物加鈣組(MIH+ CaCO₃ ; MIHC)、高劑量大豆蛋白水解物加鈣組(HIH+ CaCO₃ ; HIHC)、低劑量 NL 加鈣組(LNL+ CaCO₃ ; LNLC)、中劑量 NL 加鈣組(MNL+ CaCO₃ ; MNLC) 及高劑量 NL 加鈣組(HNL+ CaCO₃ ; HNLC)及正控制組酪蛋白磷酸胜肽(CPP+ CaCO₃ ; CPPC)共 12 組。

3. 卵巢切除小鼠誘導骨質疏鬆模式之建立

更年期婦女易患有骨質疏鬆症(Seeman, 2003)，因雌激素缺乏增加了破骨細胞之骨吸收，導致停經後女性骨質大量流失引起骨質疏鬆症(Andreopoulou., *et al* 2015)。從國家實驗動物中心購入之 144 隻四週齡大 B6 雌性小鼠養至 16 週齡大時，在第 17 週開始時，除了 CON 組及 CC 組依照原本模式餵食不進行手術，其餘各組小鼠進行 OVX 以建立骨質疏鬆之動物

模式模擬更年期婦女骨質疏鬆症。以 Avertin 對小鼠腹腔注射進行麻醉，注射約 10 min 後，捏其腳掌確認小鼠進入麻醉狀態後，以棉球沾取酒精消毒小鼠背部皮膚，將小鼠背部朝上方，用大剪剪開背部正中央皮層(頭至尾約體長 2/3 處)，拉住皮層往左及右邊移動，可於肌肉層看到腹腔中有乳白色組織處，以小剪剪開肌肉層，利用小鑷子夾出卵巢，以加熱燒紅之小鑷子將卵巢燙掉摘除，用縫線將肌肉層縫合後，以同樣方法摘除另一側卵巢並縫合傷口。待兩側肌肉層縫合完畢，以皮釘釘住皮層，並於傷口處塗上碘酒將小鼠放入備有乾淨墊料、飼料及水瓶的鼠籠中保溫，等待小鼠復甦並觀察其狀況，總共有 120 隻 B6 小鼠進行手術。所有小鼠休息恢復四周使傷口癒合，確認其健康狀況後開始進行餵食，剔除死亡隻數及恢復情況不佳小鼠後，含未手術組別共有 128 隻參與本次實驗。

4. 實驗動物檢體處理與分析

將小鼠誘導至骨質疏鬆模式(20 週齡)，即進入實驗階段，除餵食基礎飼料之外再另外管餵樣品，餵食期間每週測定小鼠體重一次，管餵餵食 8 週後犧牲，小鼠以 CO₂ 安樂死方式進行犧牲，剪開小鼠皮層及肌肉層，從肝靜脈進行採血以蒐集其血液樣品，全血樣品在室溫下放至兩小時後，在 4 °C 下、轉速 3000 × g 離心 20 min，分離出上層血清，並將血清放置 -20 °C 送至台南市尚捷醫學檢驗所進行生化檢驗。採集小鼠內臟，包含心、肝、脾、腎、子宮、腎周脂肪及腹腔脂肪並各別秤重記錄重量，秤重完畢後將左腎、肝臟大葉放入 10 % 福馬林溶液(Formalin solution)浸泡，固定三天後送至中興大學獸醫系廖俊旺教授實驗室進行修片及判讀，經由石蠟包埋製作成組織切片，以蘇木紫及伊紅進行染色(Hematoxylin & Eosin stain, H&E stain)，

其餘部分則放入夾鏈袋中以-20 °C 冰箱保存。接著取左右股骨、脛骨，剝除不必要的肌肉軟組織，並以手術刀刮除難取下的肌肉組織，使骨頭完整裸露出來，各別秤重後放置在 75 % 酒精中保存直至分析，並將所有臟器、骨頭重量進行計算相對臟器之重量，腎周脂及腹腔脂肪則是將兩者重量加總後再進行計算。

5. 血清檢體分析

血清中肝腎功能參數之分析，分析項目包括丙胺酸轉胺酶(Alanine aminotransferase ; ALT)、天門冬胺酸轉胺酶 (Aspartate aminotransferase ; AST)、肌酸酐 (Creatinine)、血尿素氮 (Blood urea nitrogen ; BUN)、血清中鈣離子、磷離子含量。以 ELISA Kit 測定血清中骨代謝之生化指標骨鈣素(Osteocalcin ; OT)。其測定方法是根據酵素結合免疫吸附分析法之三明治法(Sandwich-ELISA)原理測定。其測定原理為利用抗原抗體之間專一性鍵結特性，對檢體進行檢測；由於結合固體成載物上之抗原或抗體仍可具有免疫活性，因此設計其鍵結機制後配合酵素呈色反應即可顯示特定抗原或抗體是否存在，並可利用呈色之深淺進行定量分析。

(1) 丙胺酸轉胺酶(ALT)、天門冬胺酸轉胺酶(AST)：

ALT 及 AST 是由肝臟細胞所製造的酵素，有助於肝臟分解其他蛋白質使身體更容易吸收，兩者都存在於肝細胞中，當肝臟受損或發炎時，ALT 及 AST 會釋放到血液中使得數值上升(Hall *et al.*, 2012)。

(2) 血尿素氮(BUN)：

BUN 是最常見的腎功能檢測指標，當生物體中蛋白質代謝廢物會以尿素氮型式回到血液中，借由腎臟過濾後和尿液一起排出體外。當腎

功能差、身體脫水或心臟衰竭時，其值會升高（衛生福利部國民健康署，2018）。

(3) 血清肌酸酐(Creatinine)：

Creatinine 和 BUN 一樣是常見的腎功能檢測指標，其是由肌肉活動分解而來，健康的腎臟會將它從血液中過濾和尿液一起排出體外。當腎功能變差時，其值亦會升高(衛生福利部國民健康署, 2018)。

(4) 血鈣：

血鈣為骨骼代謝指標之一，血鈣在維持體內維持一定的平衡，當鈣質攝取量不足的時候，藉由副甲狀腺的調節，骨頭就會釋放鈣到血液中，使身體維持平衡與生理作用(Bhattarai et al., 2014)。

(5) 血磷：

在生物學上，維持磷的平衡對骨骼及腎臟健康具有絕對重要性，不健康的腎臟無法將磷代謝，因此多餘的磷會堆積在血中，造成高血磷，在鈣磷不平衡的狀況下，可能誘發嚴重的副甲狀腺機能亢進，骨中的磷流失，進而導致嚴重骨骼病變發生(Clark et al., 1990; Penido et al., 2012)。

(6) 骨鈣素(OCN)：

OCN 是骨骼內非膠原蛋白中含量最多的一個物質，由 49 個胺基酸組成的長鏈蛋白(MW5.8 kDa)，並含有三種 γ -羧基谷胺酸。在骨形成過程中，OCN 是由造骨細胞製造，其製造依賴維生素 K 且會被維生素 D3 刺激。在骨形成過程中，新合成的 OCN 進入骨基質中，另一小部分直接分泌到血液中。Osteocalcin 濃度和許多骨骼新陳代謝疾病有關。如骨質疏鬆症、原發性和續發性副甲狀腺機能亢進等(Bhadricha et al., 2019)。利用 OCN Kit 可測定血清中骨鈣素含量，原理是將一級抗體預

先 coating 至 96well 盤中，加入血清後，血清中抗原會與一級抗體結合，再加入帶有 Biotin 的二級抗體，再加入呈色劑 Horseradish peroxidase (HRP)，HRP 帶有 Avitin，其會與 Biotin 進行特異性的結合，加入 TMB 顯色劑會與 HRP 進行氧化還原反應進而形成藍色化合物，最終加入中止液中止反應，顏色會由藍色轉變回黃色，在 450nm 有最大吸光值，當吸光值越高表示骨鈣素濃度越高，骨合成作用越好。

6. 小鼠股骨之骨小樑測定

利用高解析度微型電腦斷層掃描儀(Micro-computed Tomography ; μ CT) 進行分析，這是一種非破壞性的 3D 成像技術，可以在不破壞檢體的情況下掃描其內部顯微結構，方法是利用錐形 X 射線進行照射，利用能量強弱不同的 X 光對檢體進行照射，並由偵測器吸收測量，偵測器將其轉換成電流，再將資料傳給電腦，電腦再將其重建出斷層面影像。本次試驗交由台灣小鼠診所利用 Skyscan1076 微電腦斷層掃描分析系統進行掃描，犧牲後取小鼠左邊股骨進行骨小樑分析，將股骨以 75 % 酒精保存並掃描。以 $9\mu\text{m}$ 高解析度進行掃描，照射之長度為 17 mm，測定股骨遠端之骨小樑數目及結構，計算出全部股骨之骨小樑體積比(Trabecular bone volume ; BV/TV)、平均骨小樑厚度(Mean trabecular thickness ; Tb.Th)、骨小樑數目(Trabecular number ; Tb.N)、骨小樑連接密度(Connectivity density ; Conn.Dn)、骨小樑分離度(Trabecular separation ; Tb.Sp)、評估骨小樑表面凹面及凸面之比率得到骨小樑模式因數(Trabecular bone pattern factor, TB.Pf)、結構模型指數(Structure model index ; SMI)及骨異向性程度(Degree of anisotropy ; DA)。BV/TV 該指標為皮質骨和鬆質骨骨量評價指標，對於髓腔內鬆質骨而言，該比值能夠反應不同樣本骨

小梁骨量的多寡，該值增高表示骨合成代謝大於分解代謝，骨量增加，反之亦然，因此能夠間接反應骨代謝狀況。SMI 定義為骨小樑屬於屬於板狀或桿狀的程度，SMI 指數從 0 至 3，發生骨質疏鬆時骨小樑從板狀轉為桿狀，SMI 值會上升。DA 定義為區域橢圓中長徑和短徑的比值，患有骨質疏鬆症時骨小樑承受重量上升，則 DA 值會越大。Tb.Pf 用於描述骨小樑表面凹凸程度，患有骨質疏鬆症時，該值上升表示骨小樑由板狀向桿狀變化。Conn.Dn 表示每立方毫米體積中骨小樑網狀結構之間的連接數量。

三、統計分析

所有實驗數據結果皆以平均值±標準差(Mean ± SD)表示，統計分析使用 SAS (Statistical analysis system) 9.4 分析軟體，再以 Duncan's multiple-range test 檢定兩兩之間是否有顯著差異，當 $p < 0.05$ 於統計上認定有顯著差異，並以不同英文字母標示。

肆、結果與討論

本試驗目的為以卵巢切除小鼠誘導骨鬆模式評估 IH 及 NL 合成胜肽改善骨鬆之能力。研究結果主要分為兩個部分進行討論，第一部分為 CON、CC、OVX 及 OC 組，探討健康鼠、卵巢切除誘導骨質疏鬆模式鼠(OVX)手術誘導後餵食碳酸鈣後之差異。第二部分則探討 OVX 鼠除了口服碳酸鈣後在另外餵食未水解大豆蛋白(ISPC)、低中高劑量大豆蛋白水解物(IHC)、低中高劑量 NL 合成胜肽(NLC)及對照組酪蛋白磷酸胜肽(CPPC)對於促進鈣吸收之改善效果。

一、口服鈣對健康小鼠(CON)及 OVX 小鼠之影響

(一)口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠體重、攝食量及臟器相對重量之影響

本次試驗利用 C57BL/6J (B6)雌性小鼠進行卵巢切除模擬女性更年期後骨質疏鬆(OVX)為探討模式，餵食健康鼠及 OVX 鼠碳酸鈣並探討其對於小鼠骨質之影響。圖五為本次試驗口服鈣對 CON、CC、OVX、OC 組別小鼠體重影響，第 16 週時進行手術誘導 OVX 及 OC 組體重與 CON 及 CC 組相比有下降趨勢，但在統計上無顯著差異，在第 18 至 28 週經過卵巢切除手術組別體重皆顯著高於 CON 及 CC 組，手術誘導前每組體重約落在 20~21 g 左右，經過手術後組別在地 18 週時體重顯著增加至 25~26 g 左右($P < 0.05$)，雌激素可以抑制脂肪細胞的生成，當分泌減少會導致體重增加(Mok *et al.*, 2018)。圖六為口服碳酸鈣對攝食量之影響，所有組別均在 16 週時攝食量下降而在第 19 週後逐漸趨於穩定，其原因為在第 16 週時進行雙側切除卵巢手術因而導致食量下降。表一為健康小鼠與 OVX 小鼠口服鈣前後其臟器、股骨相對重量變化，相對重量計算方式為(臟器重量/體重) $\times 100\%$ ，臟器相

對重量是指臟器重量與體重的質量比，健康的臟器相對重量是一個恆定的數值，此值可以用來評斷動物臟器是否受到影響，為動物毒理學研究中一個重要的指標(Piao *et al.*, 2013)。結果顯示心臟、肝臟、脾臟之臟器相對重量方面，CON 及 CC 組與手術組 OVX 及 OC 組之間均無顯著差異，表示經由手術及口服碳酸鈣後對臟器無影響。OVX 組及 OC 組腎臟相對重量分別為 $1.03 \pm 0.10\%$ 及 $1.01 \pm 0.06\%$ 與 CON、CC 組相比有顯著差異($P < 0.05$)，參考 The Jackson Laboratory 所發佈之 C57BL/6J 小鼠的生理參數表，週齡 26 週 B6 小鼠其左腎與右腎臟器相對重量為 $1.09 \pm 0.18\%$ of body weight，OVX 組與 OC 組之腎臟相對重量均在正常範圍內。脂肪重量經 OVX 後與 CON 組相比從 $1.82 \pm 0.77\%$ 顯著增加至 $3.02 \pm 0.11\%$ ，子宮及股骨相對重量 CON 與 OVX 組重量皆有顯著差異($P < 0.05$)，表示經由 OVX 後的老鼠體內脂肪量會增加，股骨及子宮重量則會減輕。

(二)口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠血清生化指數之影響

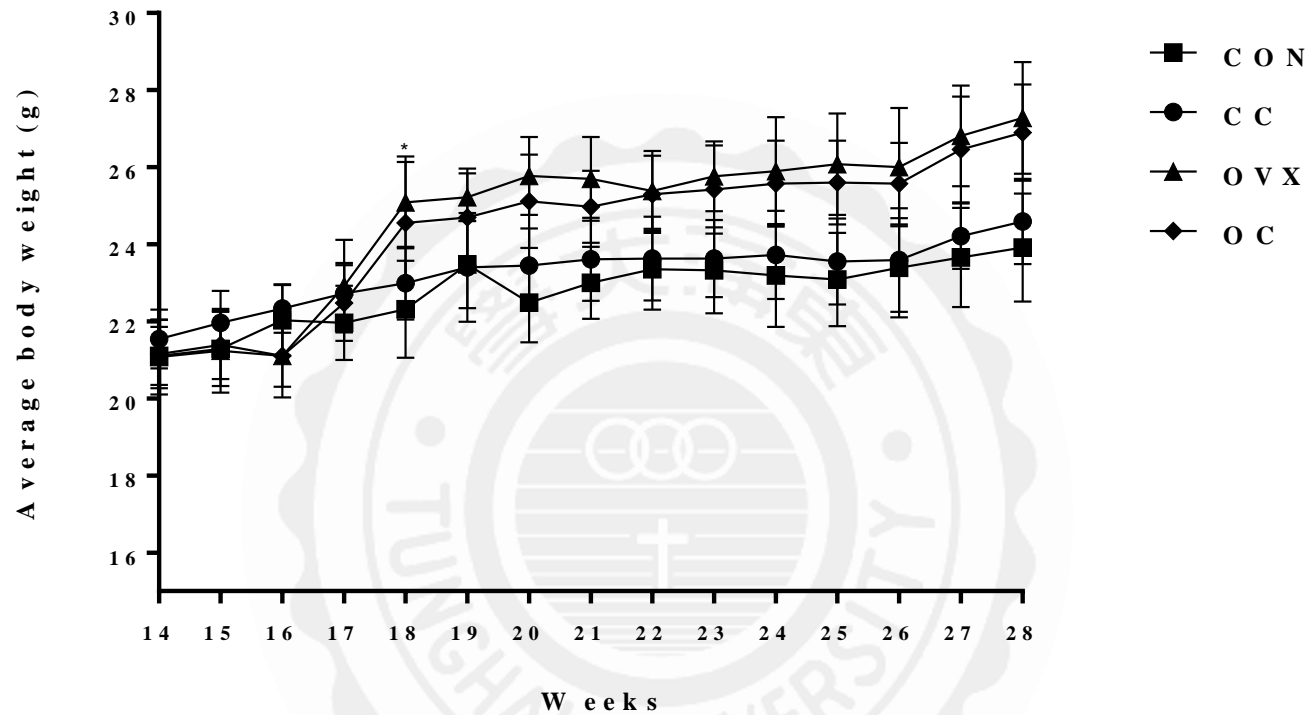
表二為口服碳酸鈣後對健康小鼠及 OVX 小鼠其肝、腎功能生化指數及血液中鈣、磷及骨鈣素含量之影響

1.肝功能指數

CON、CC、OVX 及 OC 組在肝指數 AST 無顯著差異，OVX 組經卵巢切除後 ALT 為 30.50 ± 5.0 U/L，與 CC 組之 26.00 ± 2.18 U/L 相比有顯著提升，但與 CON 組無顯著差異，顯示其 ALT 在健康小鼠正常範圍內，並未對肝臟功能造成影響。

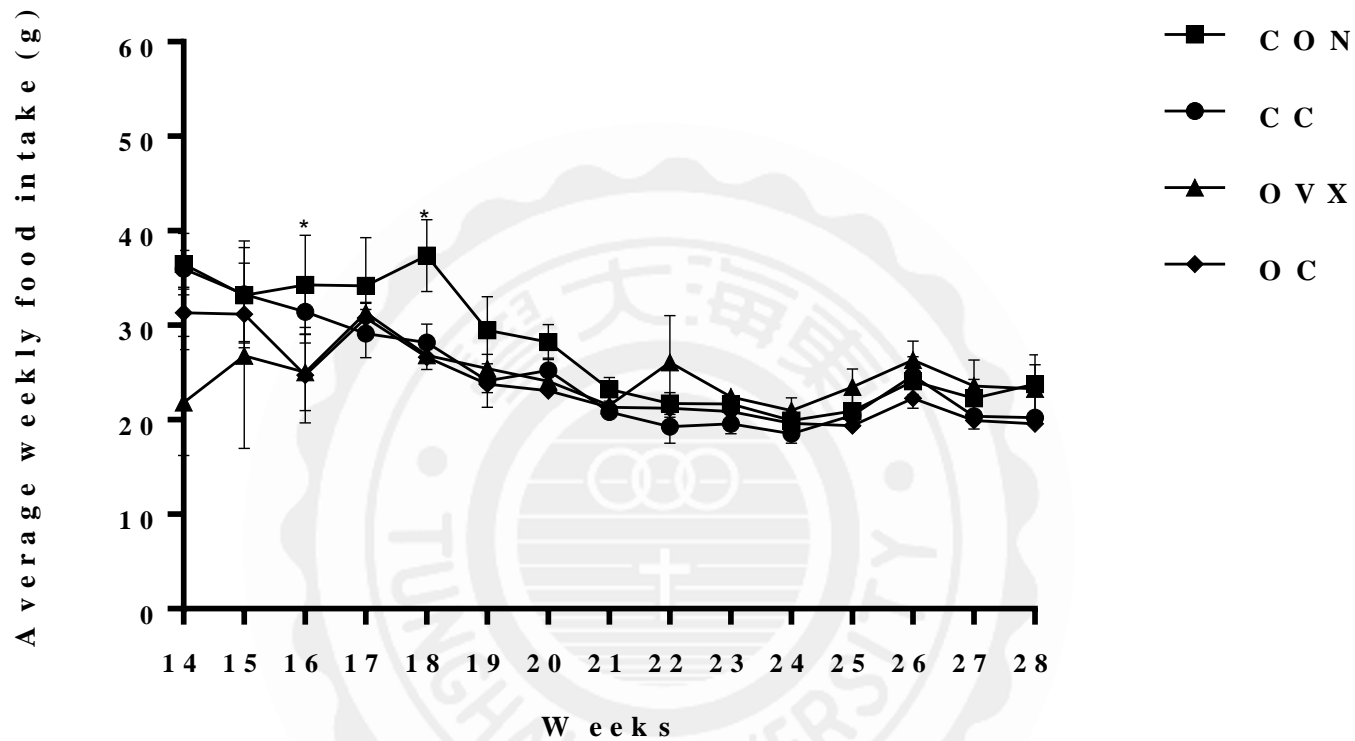
2.腎功能指數

參考 The Jackson Laboratory 所發佈之 B6 小鼠 BUN (Blood urea nitrogen



圖五、試驗期間口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠平均體重之影響

Fig 5. Effect of oral CaCO_3 on average body weight of healthy mice (CON) and OVX mice during the administration period. * $p < 0.05$ indicates a statistically significant difference from the control group. Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.



圖六、試驗期間口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠平均攝食量之影響

Fig 6. Effect of oral CaCO_3 on average weekly food intake of healthy mice (CON) and OVX mice during the administration period.* $p < 0.05$ indicates a statistically significant difference from the control group.

Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.

表一、口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠臟器及股骨相對重量之影響

Table 1. Effect of oral CaCO₃ on relative organ weight and femoral weight of healthy mice (CON) and OVX mice.

Treatment	Relative organ weight (%) ^A						
	Heart	Liver	Kidney	Spleen	Fat	Uterus	Right femur
CON	0.44±0.06 ^a	4.45±0.38 ^a	1.13±0.15 ^a	0.26±0.02 ^a	1.82±0.77 ^b	0.54±0.22 ^a	0.29±0.01 ^a
CC	0.47±0.04 ^a	4.56±0.38 ^a	1.15±0.06 ^a	0.27±0.01 ^a	2.69±0.67 ^{ab}	0.42±0.15 ^a	0.30±0.01 ^a
OVX	0.44±0.05 ^a	4.64±0.27 ^a	1.03±0.10 ^b	0.28±0.03 ^a	3.02±1.11 ^a	0.11±0.07 ^b	0.26±0.02 ^b
OC	0.49±0.08 ^a	4.67±0.29 ^a	1.01±0.06 ^b	0.27±0.02 ^a	3.80±0.91 ^a	0.29±0.29 ^{ab}	0.26±0.02 ^b

Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.

^A Relative organ weight = (organ weight / body weight) × 100%

*Each value is expressed as mean ± SD, n=8. Mean with different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.



正常範圍約在 $27 \pm 3 \text{ mg / dL}$ ，CON、CC、OVX 及 OC 組皆在正常範圍內。Creatinine 指數中，CC 與 CON 組相比有顯著下降趨勢，而 OVX、OC 組均無顯著差異。

3.血鈣、血磷及骨鈣素含量

經卵巢切除後 OVX 組血液中鈣及骨鈣素含量比 CC 組來的高但與健康小鼠無顯著差異，血液中磷及骨鈣素含量所有組別均無顯著差異，經由 OVX 後使血液中鈣含量上升，由林(2005)台灣中醫臨床醫學雜誌中所提到的骨質疏鬆可能會導致血液及細胞內鈣含量增高，推測為經由卵巢切除後骨鈣會流失至血液，使得血液中鈣濃度提升。

(三)口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠肝、腎組織之影響

圖七及圖八為本次試驗口服鈣之健康小鼠及 OVX 小鼠肝、腎組織病理切片，肝臟切片結果中，中央肝靜脈(Central vein; C)周圍肝細胞呈現六角形，細胞核較大，核仁明顯且排列整齊無空泡及細胞病變現象，對照附件五至八對應臟病理變化分數表，可發現每組均有葡萄糖累積現象，此因為犧牲前未禁食導製葡萄糖累積在肝臟中所造成的。

腎臟為生物體中重要的代謝器官之一，容易因藥物、毒素或重金屬等造成損傷，圖七為此次試驗小鼠腎臟 H&E 染色結果，可見各處理組腎絲球(Glomerulus; G)、近曲腎小管(Proximal convoluted tubule; P)及遠曲腎小管(Distal convoluted tubule; D)之間排列整齊，基底膜完整，腎小管上皮細胞排列整齊，腎組織間質中亦未發現細胞浸潤現象，與檢驗報告(附件五至附件八)比對發現肝、腎均無病理變化，表示口服鈣對小鼠並不會對肝、腎造成損傷。

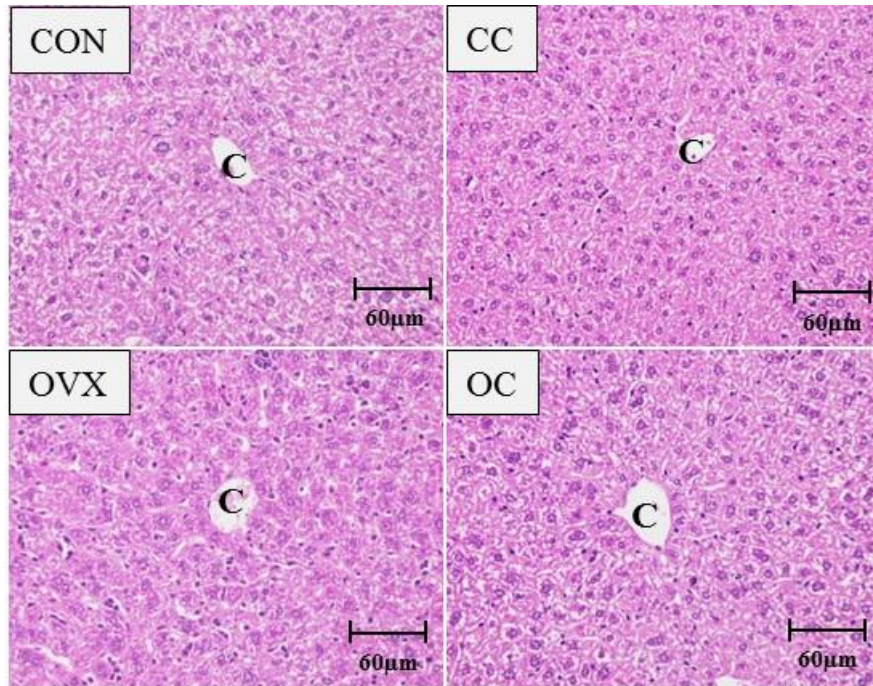
表二、口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠之血清中肝腎功能、鈣、磷及骨鈣素含量影響

Table 2. Effect of oral CaCO₃ on the serum levels of AST, ALT, BUN, creatinine, calcium, phosphorus and osteocalcin of healthy mice(CON) and OVX mice.

Treatment	AST (U/L)	ALT (U/L)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Calacium (mg/dL)	Phosphorus (mg/dL)	Osteocalcin (ng/ml)
CON	57.13 ± 10.52 ^a	29.38 ± 2.87 ^{ab}	30.86 ± 4.50 ^a	0.41 ± 0.03 ^a	11.11 ± 0.41 ^{ab}	21.71 ± 1.92 ^a	4.32 ± 0.34 ^a
CC	53.50 ± 4.95 ^a	26.00 ± 2.18 ^b	30.03 ± 3.40 ^{ab}	0.36 ± 0.03 ^b	10.90 ± 0.15 ^b	20.14 ± 1.62 ^a	3.61 ± 0.59 ^a
OVX	55.88 ± 9.04 ^a	30.50 ± 3.84 ^a	26.94 ± 3.50 ^{ab}	0.37 ± 0.05 ^{ab}	11.41 ± 0.46 ^a	21.16 ± 2.43 ^a	4.45 ± 1.53 ^a
OC	53.38 ± 6.36 ^a	29.13 ± 3.30 ^{ab}	26.69 ± 2.53 ^b	0.37 ± 0.04 ^{ab}	10.99 ± 0.33 ^{ab}	20.44 ± 3.06 ^a	4.62 ± 0.30 ^a

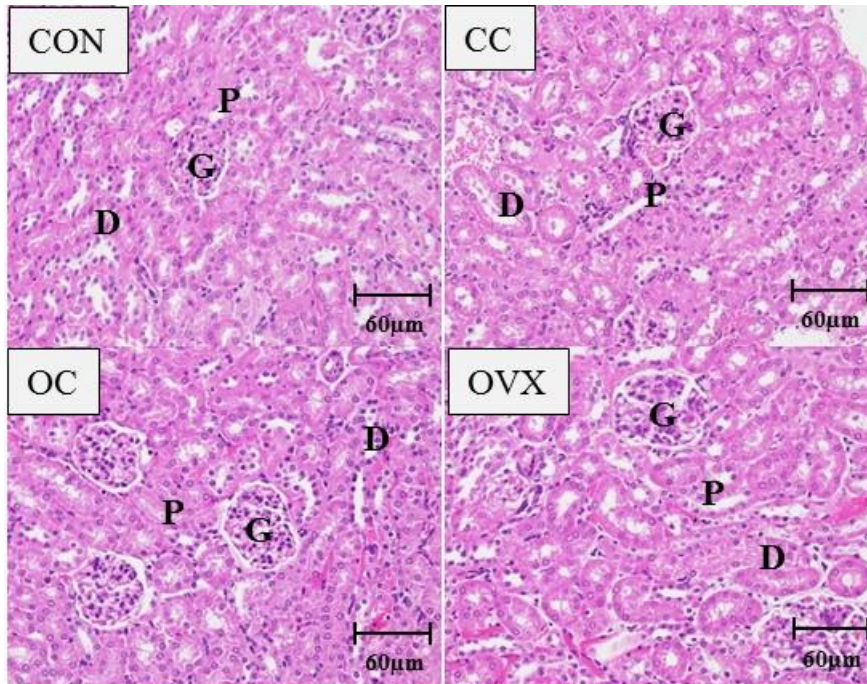
AST ; Aspatate aminotransferase. ALT; Alanine aminotransferase. BUN; Blood urea nitrogen. Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.

*Each value is expressed as mean ± SD, n=8. Mean with different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.



圖七、口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠肝臟 H&E 組織切片染色影響,C 為中央肝靜脈(圖中比例尺大小為 60µm,放大倍率為 400x)

Fig 7. Effect of oral CaCO_3 on liver stained by H&E of healthy mice (CON) and OVX mice. C indicate central vein. The images were taken 400x magnification with H&E staining. Scale bars= 60µm. Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.



圖八、口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠腎臟 H&E 組織切片染色之影響。

G、P 及 D 分別表示腎小球、近曲腎小管及遠曲腎小管(圖中比例尺大小為 60 μ m,放大倍率為 400x)

Fig 8. Effect of oral CaCO_3 on liver stained by H&E of healthy mice (CON) and OVX mice. G,P and D indicate glomerulus, proximal convoluted tubule and distal convoluted tubule, respectively. The images were taken 400x magnification with H&E staining. Scale bars= 60 μ m. Abbreviations: Symbols represent ad in the Fig 4.

(四)微電腦斷層掃描分析評估口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠骨小樑之影響

使用 μ CT 進行股骨骨小樑結構參數掃描之結果如圖九至圖十二所表示，圖十三為微電腦斷層 3D 掃描之股骨結構變化分析，圖九(A) BV/TV 為骨小樑所佔整體組織的比例，當骨質疏鬆時骨小樑會隨著骨質流失使 BV/TV 的值相對下降，CON 及 CC 組小鼠其 BV/TV 分別為 $4.23 \pm 0.5\%$ 及 $5.19 \pm 0.7\%$ ，結果顯示經 OVX 後小鼠之 BV/TV 下降至 $3.60 \pm 0.8\%$ 顯著低於 CC 組。(B) 為骨小樑厚度(Tb.Th)指的是骨小樑平均厚度，當骨質疏鬆時其值會降低，經由 OVX 後，OVX、OC 組與 CON、CC 組相比，骨小樑厚度並無顯著差異。圖十(A) CON 組之骨小樑數目(Tb.N)為 $0.75 \pm 0.1 \text{ mm}^{-1}$ ，經由 OVX 後骨小樑數目降至 $0.61 \pm 0.1 \text{ mm}^{-1}$ ，顯著低於 CON 及 CC 組但與 OC 組之間無顯著差異，(B) 為骨小樑連接密度，其值升高表示骨小樑之網狀結構之間連接緊密，結果為所有組別均無顯著差異。圖十一(A) 為骨小樑分離度(Tb.Sp)代表骨小樑之間的距離，是指骨小樑間的髓腔平均寬度，結果為經由卵巢切除造成雌激素減少所導致骨質疏鬆使得 OVX、OC 組骨小樑距離顯著高於 CON、CC 組，(B) Tb.Pf 為描述骨小樑表面凹凸程度，其值增加表示患有骨質疏鬆，CON 組 Tb.Pf 值為 33.88 ± 1.3 顯著高於其餘組別，表示骨質結構凹面多凸面少骨小樑較以桿狀結構為主。圖十二(A) SMI 則為描述骨小樑結構中板狀和桿狀的比例，其值升高表示患有骨質疏鬆，CON 組具有最高的 SMI 值為 2.80 ± 0.1 顯著高於其他組別，表示 CON 小鼠骨質多為桿狀結構，(B) 為骨異向性程度(DA)是指選定的範圍內，平均截距長度橢圓中長徑和短徑的比值，結果中所有組別 DA 值均無顯著差異，推測原因為在骨鬆初期時 DA 值會上升，但到後期時 DA 值則會減小。綜合上述結果並觀照圖十三可以發現 CON 組小鼠 SMI 及 Tb.Pf 值比其他組別高，表示骨質結構主要是

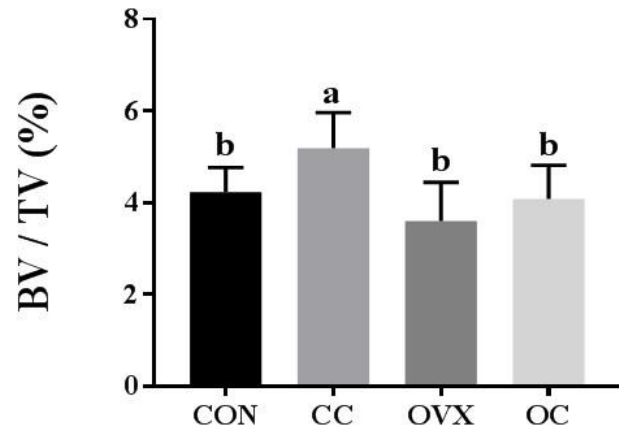
以桿狀結構為主，骨骼之間空洞少，骨小樑之間交織的網狀程度較為密集，CC 組在餵食碳酸鈣後骨量明顯增加，新生骨骼以桿狀結構為主，骨結構比 CON 組更為緻密，經手術後 OVX 組骨小樑數量相對減少，所以骨小樑之間距離增加使空洞增大，OC 組在餵食碳酸鈣後，雖能稍微增加骨小樑數目，但較無法明顯看出對於骨結構正面影響，表示碳酸鈣對於延緩骨質疏鬆可能效果較不顯著。上述結果與賴(2011)結果相比，此研究以卵巢切除小鼠評估以餵食克弗爾(Kefir)延緩骨質流失之功效，結果顯示經手術後誘導餵食碳酸鈣組別 Ca/OVX 組其 BV/TV、Tb.Th、Tb.N 及 Tb.Sp 與 OVX 和假手術 Sham 組皆無顯著差異，與本次試驗結果相呼應，表示單純口服碳酸鈣對於延緩骨質疏鬆症之效果較不明顯。

二、大豆蛋白水解物(IH)及合成胜肽(NL)對 OVX 小鼠之影響

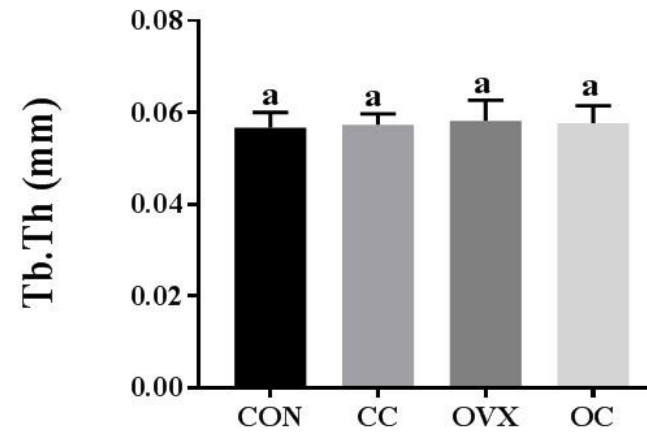
(一)餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠體重、攝食量及臟器相對重量之影響

圖十四及圖十五為餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠體重及攝食量變化，第十四週時各組小鼠平均體重約為 20~22 g，每隻小鼠每週平均攝食量約為 20~40 g，本試驗在小鼠週齡 16 週時進行誘導，攝食量降至 20~30 g，在第 18 週後穩定上升，體重變化經誘導後每週穩定攀升，在小鼠 28 週齡時體重顯著上升至 24~27 g ($P < 0.05$)，攝食量則漸趨於下降，推測可能小鼠因年齡增長及基礎代謝率下降而使得攝食量減少體重增加。表三為 OVX 小鼠餵食不同劑量 IH 及 NL 對臟器相對重量影響之結果，心臟重量各組均無顯著差異，在餵食 LNLC、MNLC 組肝臟相對重量與 OVX 組相比有顯著下降，但與 HIHC、ISPC、HNLC 及 CPPC 組比較無顯著差異，腎臟相對重

(A)

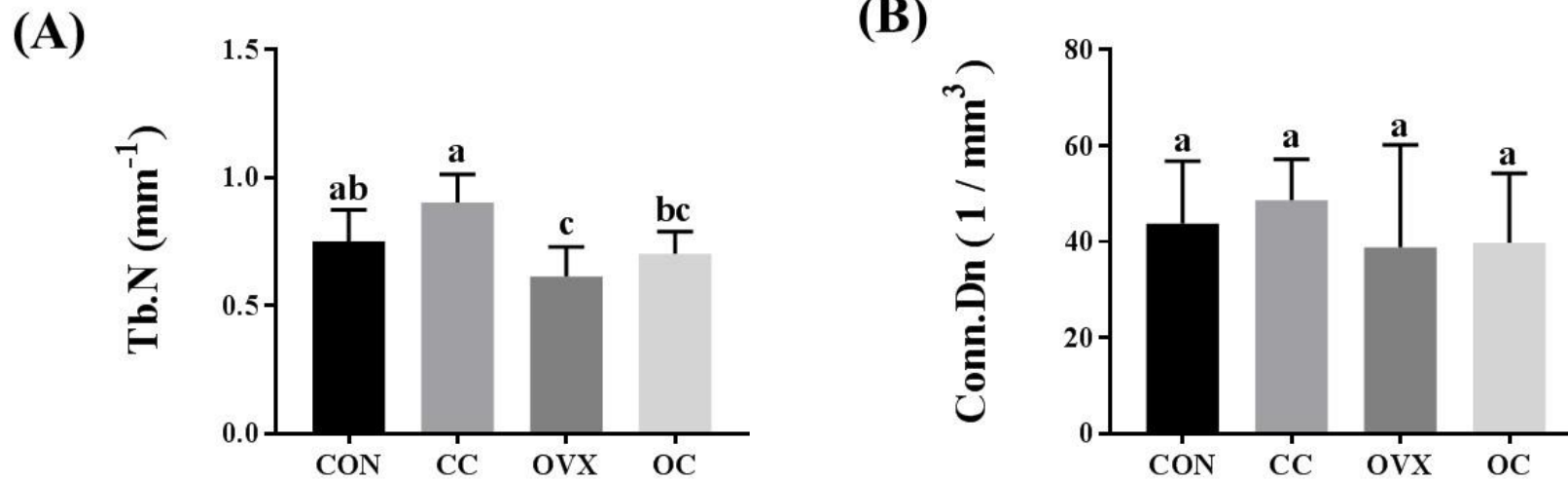


(B)



圖九、口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠骨小樑結構 BV/TV 及 Tb.Th 之影響

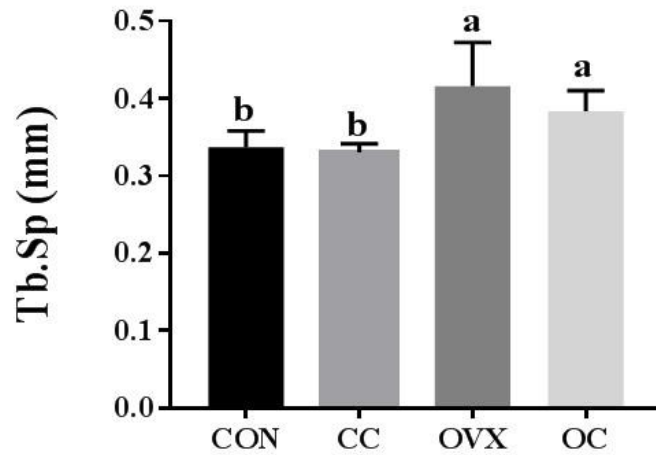
Fig 9. Effect of oral CaCO_3 on (A) BV/TV, trabecular bone volume/tissue volume and (B) Tb.Th, trabecular thickness of the distal femoral metaphyseal trabecular bone of healthy mice (CON) and OVX mice. Bar represent mean \pm SD, n=8. Mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.



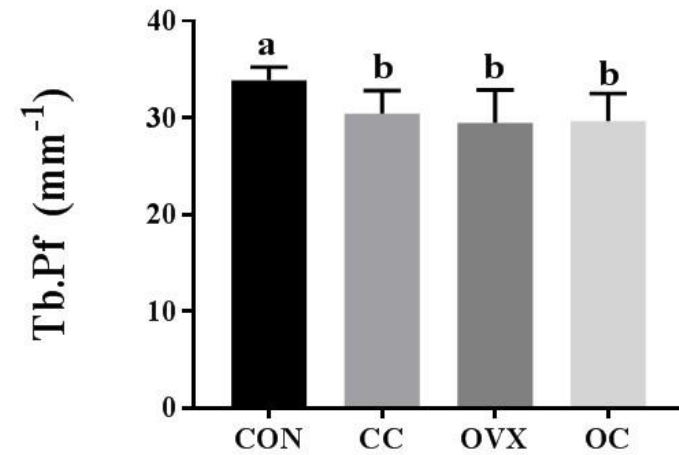
圖十、口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠骨小樑結構 Tb.N 及 Conn.Dn 之影響

Fig 10. Effect of oral CaCO₃ on (A) Tb.N, trabecular number and (B) Conn.Dn, connective density of distal femoral metaphyseal trabecular bone of healthy mice (CON) and OVX mice. Bar represent mean \pm SD, n=8. Mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.

(A)

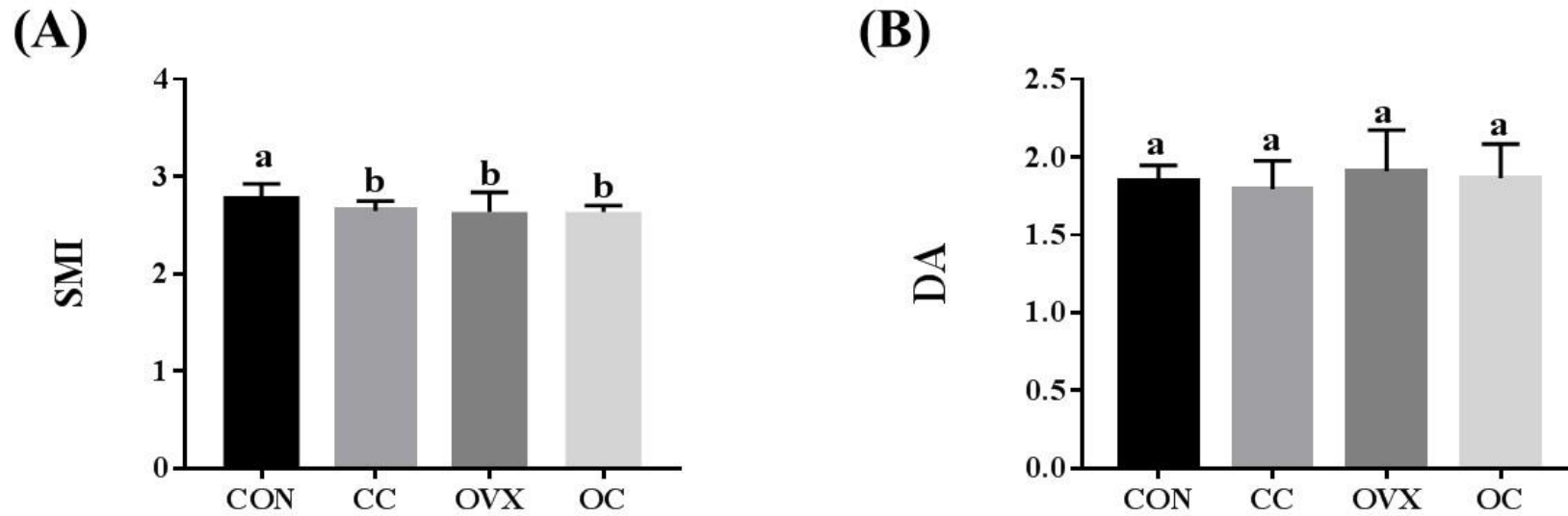


(B)



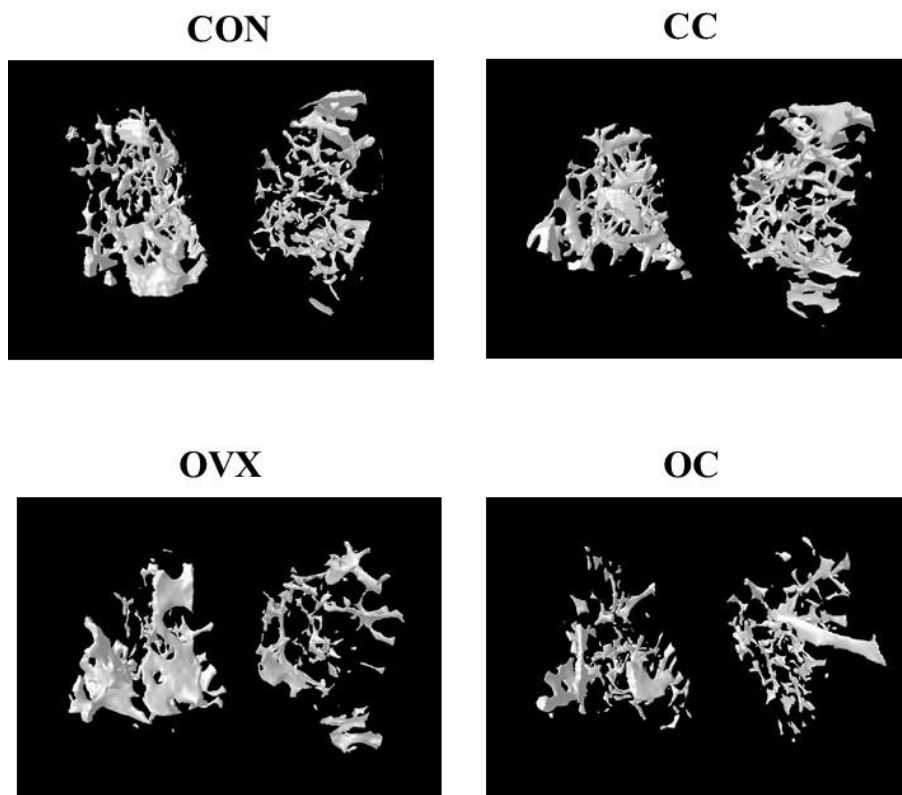
圖十一、口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠骨小樑結構 Tb.Sp 及 Tb.Pf, 之影響

Fig 11. Effect of oral CaCO_3 on (A) Tb.Sp, trabecular separation and (B) Tb.Pf, trabecular pattern factor of the distal femoral metaphyseal trabecular bone of healthy mice (CON) and OVX mice. Bar represent mean \pm SD, n=8. Mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.



圖十二、口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠骨小樑結構之 SMI 及 DA 之影響

Fig 12. Effect of oral CaCO_3 on (A) SMI, structure model index and (B) DA, degree of anisotropy of the distal femoral metaphyseal trabecular bone of healthy mice (CON) and OVX mice. Bar represent mean \pm SD, n=8. Mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.



圖十三、3D 微電腦斷層掃描分析口服鈣對 CON 及 OVX 小鼠股骨骨質之影響

Fig 13. A three-dimensional tomographic rendering of healthy (CON) and OVX mice femur reveals the complexity of the bone structure on effect of oral CaCO_3 . Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.

量除 LNLC 與 CPPC 相比有顯著差異之外，其餘組別無重量無顯著差異，脾臟相對重量 CPPC 組顯著高於 OVX 及 OC 組，參考 The Jackson Laboratory 所公佈之 26 週齡大 B6 小鼠生化指數表，其肝、腎、脾臟器相對重量均落在正常範圍內，其範圍分別為 4.21 ± 0.38 、 1.09 ± 0.18 及 0.33 ± 0.04 (% of body weight)，相對重量可能會因鼠齡、飼養方式及犧牲手法而有些微差異。脂肪相對重量經卵巢切除後顯著提升，子宮重量各組之間與 OVX 組無顯著差異，以 OC 組子宮重量最重，餵食高劑量 IHC 後可顯著提升股骨重量，上述結果表示，餵食不同的樣品對於影響臟器重量並沒有相關性。

(二) 餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠血清生化指數之影響

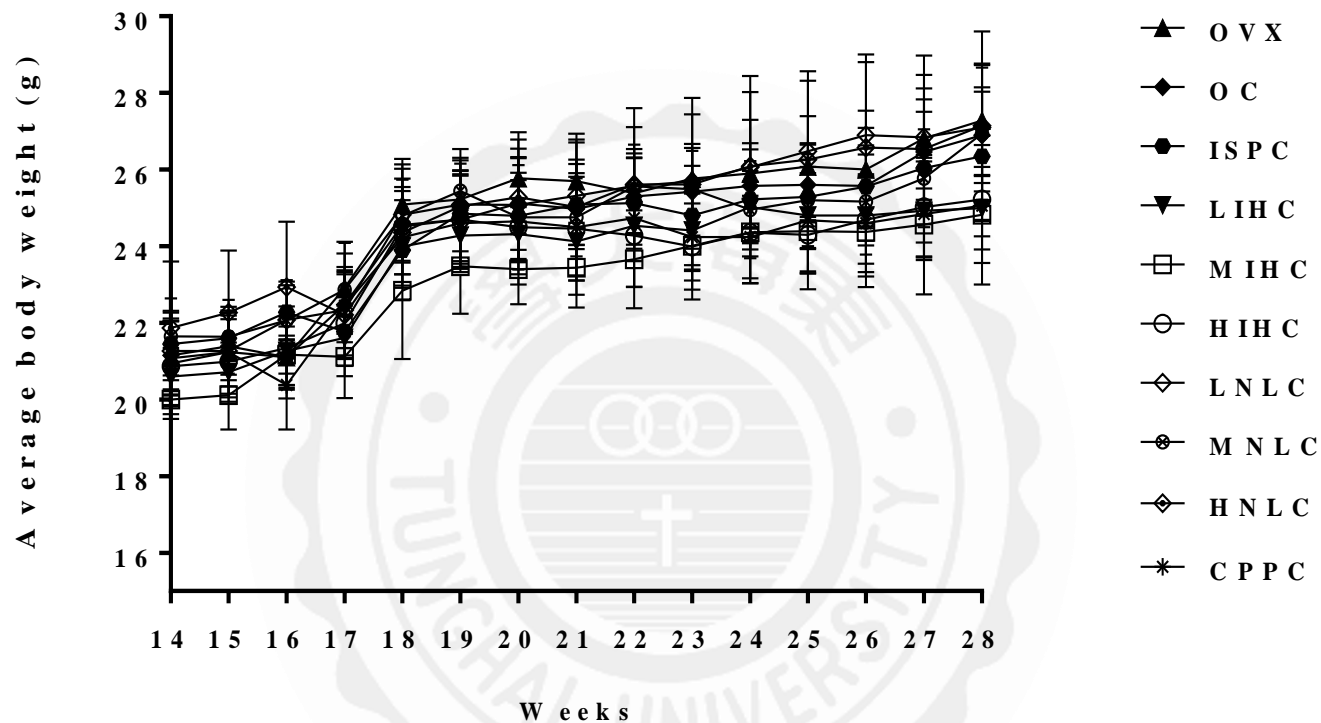
表四為不同劑量大豆蛋白水解物對 OVX 小鼠肝、腎功能生化指數及血液中鈣、磷及骨鈣素含量之變化

1. 肝功能指數

肝功能指數 AST 及 ALT 在餵食 HNLC 及 CPPC 時與 OVX 組相比數值顯著下降，顯示餵食高劑量 NL 可有效降低肝指數，其餘組別與 OVX 組及 OC 組相比無顯著差異。

2. 腎功能指數

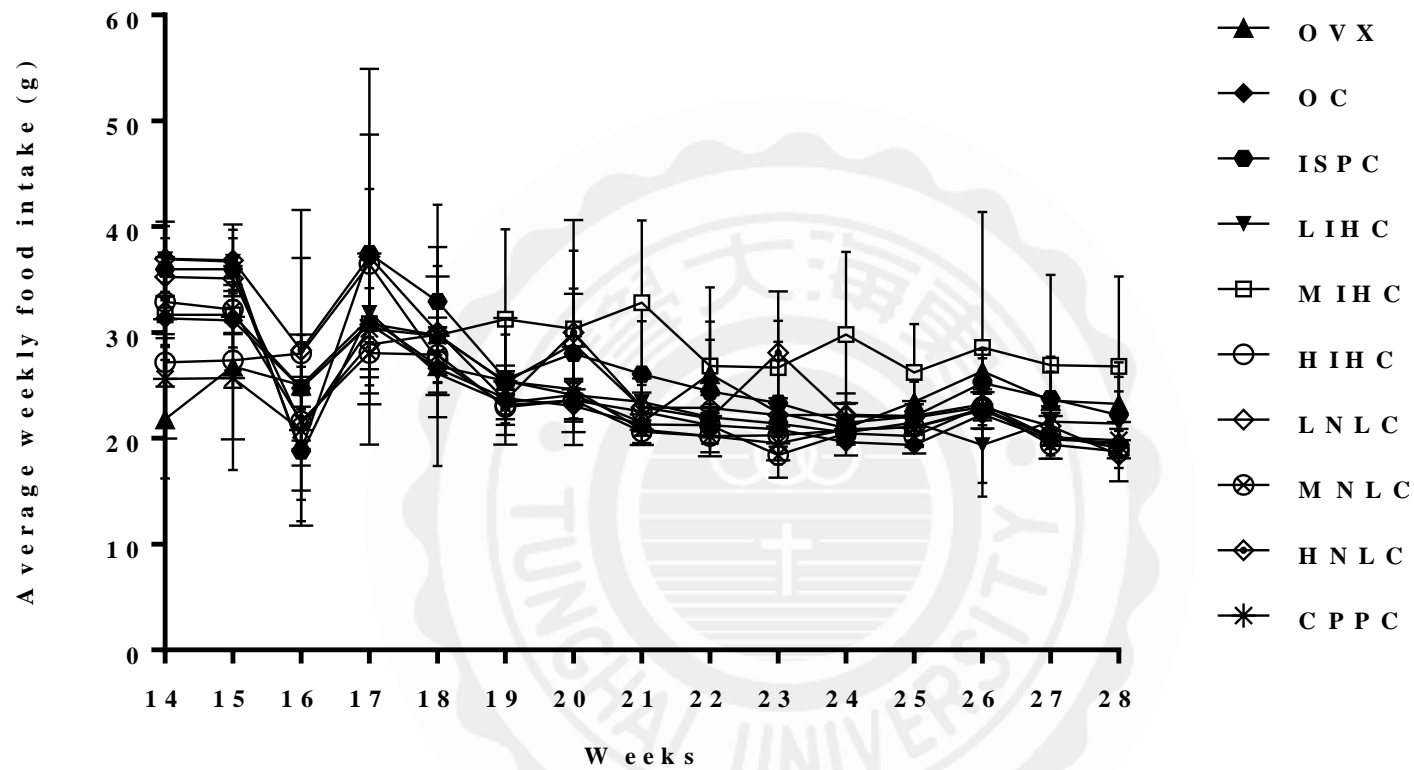
BUN 及 creatinine 為評估腎功能指標的重要指標之一，當腎功能出現障礙時，creatinine 及 BUN 會累積在血液中無法排出體外，使得數值上升，BUN 指數在餵食 MNLC 及 CPPC 後顯著低於 OVX 及 OC 組，在餵食樣品 HIHC、低中高劑量 NL 及 CPPC 後可有效降低血液中 creatinine 含量，其餘組別之 BUN 及 creatinine 與 OVX 及 OC 組相比則無顯著差異。



圖十四、試驗期間餵食不同劑量之大豆蛋白水解物(IH)及合成胜肽(NL)對 OVX 小鼠平均體重之影響

Fig 14. Effect of oral different dosage of IH and NL on average body weight of OVX mice during the administration period.

Abbreviations: Symbols represent ad in the Fig 4.



圖十五、試驗期間餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠平均攝食量之影響

Fig 15. Effect of oral different dosage of IH and NL on average weekly food intake of OVX mice during the administration period. Abbreviations: Symbols represent ad in the Fig 4.

表三、餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠臟器及股骨相對重量之影響

Table 3. Effect of oral different dosage of IH and NL on relative organ weight and femoral weight of OVX mice.

Treatment	Relative organ weight (%) ^A						
	Heart	Liver	Kidney	Spleen	Fat	Uterus	Right femur
OVX	0.43±0.05 ^a	4.64±0.27 ^a	1.03±0.10 ^{ab}	0.28±0.03 ^{bc}	3.02±1.11 ^{ab}	0.11±0.07 ^b	0.26±0.02 ^{ab}
OC	0.50±0.08 ^a	4.67±0.29 ^{abc}	1.01±0.06 ^{ab}	0.27±0.02 ^c	3.80±0.91 ^a	0.29±0.29 ^a	0.25±0.02 ^b
ISPC	0.49±0.03 ^a	4.21±0.54 ^{cd}	1.09±0.10 ^{ab}	0.32±0.03 ^{ab}	2.45±1.09 ^{ab}	0.18±0.15 ^{ab}	0.27±0.02 ^{ab}
LIHC	0.51±0.04 ^a	4.80±0.50 ^{ab}	1.06±0.06 ^{ab}	0.30±0.04 ^{abc}	2.86±0.48 ^{ab}	0.15±0.09 ^{ab}	0.28±0.02 ^{ab}
MIHC	0.51±0.06 ^a	4.56±0.53 ^{abc}	1.07±0.07 ^{ab}	0.30±0.08 ^a	1.99±0.63 ^b	0.18±0.14 ^{ab}	0.27±0.03 ^{ab}
HIHC	0.51±0.09 ^a	4.19±0.21 ^{cd}	1.09±0.10 ^{ab}	0.33±0.06 ^{ab}	2.16±0.52 ^b	0.19±0.16 ^{ab}	0.29±0.01 ^a
LNLC	0.47±0.07 ^a	3.84±0.12 ^d	0.98±0.04 ^b	0.29±0.02 ^{abc}	3.20±1.79 ^{ab}	0.14±0.06 ^{ab}	0.27±0.01 ^{ab}
MNLC	0.50±0.07 ^a	3.84±0.26 ^d	1.04±0.09 ^{ab}	0.29±0.03 ^{bc}	2.90±1.32 ^{ab}	0.06±0.04 ^b	0.27±0.02 ^{ab}
HNLC	0.45±0.06 ^a	4.33±0.31 ^{bcd}	1.04±0.06 ^{ab}	0.31±0.05 ^{abc}	3.32±1.35 ^{ab}	0.10±0.04 ^b	0.28±0.02 ^{ab}
CPPC	0.47±0.03 ^a	4.27±0.21 ^{cd}	1.10±0.13 ^a	0.34±0.04 ^a	2.41±0.95 ^{ab}	0.13±0.07 ^b	0.27±0.03 ^{ab}

Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.

^ARelative organ weight = (organ weight / body weight) × 100%

*Each value is expressed as mean ± SD, n=8. Mean with different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

3. 血鈣、血磷及骨鈣素含量

血鈣含量中餵食樣品組數值除 MNLC 組外其餘組別與 OVX 組相比雖在統計上無顯著差異，但數值均有下降趨勢，推測為餵食樣品後使小鼠體內鈣吸收增加並達到平衡，因此減少血液中鈣含量。其中以 LIHC、HIHC、MNLC 組血鈣含量有顯著下降趨勢，血磷含量在餵食低中高劑量 IH、NL 及 CPPC 組比 OVX 及 OC 組顯著降低，其中以 HNL 與正對照組 CPPC 組相比下有相同之效果，與蔣(2011)論文結果比較，其是利用 OVX 小鼠誘導骨鬆並餵食乳酸菌發酵豆漿牛奶評估對於預防骨質疏鬆之能力，在血清生化指數結果中其血磷含量在餵食樣品後顯著降低，與本次試驗結果有相同趨勢。血清中骨鈣素含量在餵食樣品 ISPC、低中高劑量之 NL 和可顯著提升其含量，與 CPPC 組有相同之效果。

(三) 餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠肝、腎組織影響

圖十六及圖十七為本次試驗餵食 IH 及 NL 之小鼠肝、腎組織病理切片，在所有組別肝臟組織切片中，中央肝靜脈(Central vein)周圍肝細胞呈現六角形，細胞核較大，核仁明顯且排列整齊無空泡及細胞病變現象，MNLC 組切片圖中未見中央肝靜脈，應是做切片時所選部位未將中央肝靜脈包含進去，但不影響觀察結果，對照附件五至附件八所對應之肝臟病理變化分數表，可發現每組均有醣原累積現象，此因為犧牲前未禁食導製葡萄糖累積在肝臟中所造成的。圖十六為此次試驗小鼠腎臟 H&E 染色結果，可見各處理組腎臟細胞排列整齊，腎絲球(Glomerulus; G)、近曲腎小管(Proximal convoluted tubule; P)及遠曲腎小管(Distal convoluted tubule; D)沒有明顯細胞增大或空泡現象，亦未發現細胞浸潤，與檢驗報告(附件五至附件八)比對發現肝、腎均無病理變化，表示此次實驗餵食之樣品均不具有毒性而造成肝、腎損傷。

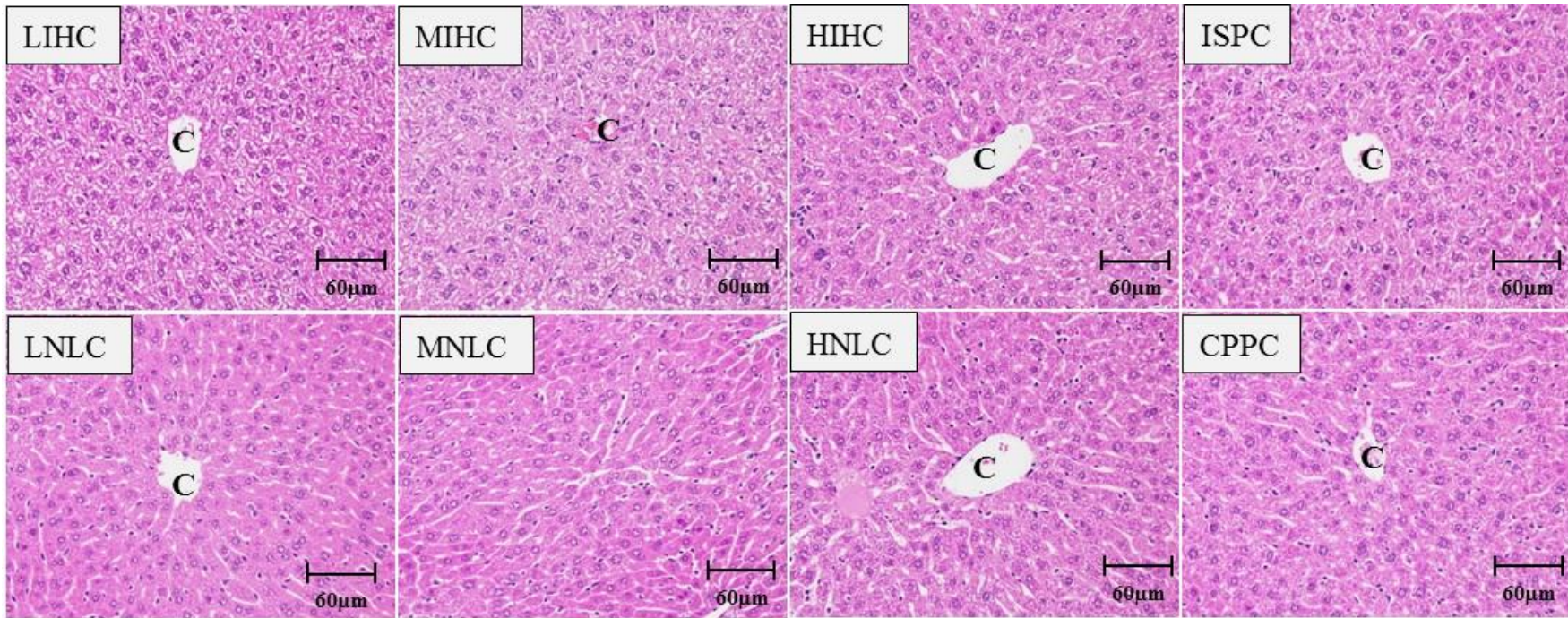
表四、餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠血清中肝腎功能、鈣、磷及骨鈣素含量之影響

Table 4. Effect of oral different dosage of IH and NL on the serum levels of AST, ALT, BUN, creatinine, calcium, phosphorus and osteocalcin on OVX mice

Treatment	AST (U/L)	ALT (U/L)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Calcium (mg/dL)	Phosphorus (mg/dL)	Osteocalcin (ng/ml)
OVX	55.88 ± 9.04 ^{ab}	30.50 ± 3.84 ^a	26.94 ± 3.50 ^{ab}	0.37 ± 0.05 ^a	11.41 ± 0.46 ^a	21.16 ± 2.43 ^a	4.45 ± 1.53 ^{cd}
OC	53.38 ± 6.36 ^{abc}	29.13 ± 3.30 ^{ab}	26.69 ± 2.53 ^{ab}	0.37 ± 0.04 ^a	10.99 ± 0.33 ^{bc}	20.44 ± 3.06 ^a	4.62 ± 0.30 ^{abcd}
ISPC	50.50 ± 5.89 ^{abc}	26.88 ± 2.62 ^{abc}	23.45 ± 1.58 ^{bc}	0.35 ± 0.02 ^{ab}	11.08 ± 0.31 ^{abc}	20.79 ± 1.78 ^a	5.87 ± 0.86 ^{abcd}
LIHC	45.88 ± 2.85 ^{abc}	26.25 ± 1.39 ^{abc}	29.56 ± 4.05 ^a	0.38 ± 0.04 ^a	11.00 ± 0.26 ^{bc}	16.26 ± 1.09 ^c	4.75 ± 1.05 ^{bcd}
MIHC	57.63 ± 27.21 ^a	28.50 ± 5.13 ^{ab}	28.23 ± 3.10 ^a	0.37 ± 0.02 ^a	11.08 ± 0.17 ^{abc}	16.63 ± 1.90 ^c	4.53 ± 0.56 ^b
HIHC	49.25 ± 7.33 ^{abc}	28.00 ± 3.04 ^{abc}	24.29 ± 2.08 ^{bc}	0.33 ± 0.02 ^b	10.91 ± 0.24 ^{bc}	18.54 ± 2.03 ^b	4.23 ± 0.36 ^d
LNLC	49.00 ± 11.24 ^{abc}	26.00 ± 2.69 ^{abc}	24.00 ± 4.58 ^{bc}	0.30 ± 0.04 ^c	11.28 ± 0.24 ^{ab}	14.74 ± 1.69 ^{cd}	5.12 ± 0.34 ^{abcd}
MNLC	44.25 ± 6.42 ^{abc}	26.88 ± 4.78 ^{abc}	22.56 ± 3.88 ^c	0.30 ± 0.03 ^c	10.90 ± 0.40 ^c	13.44 ± 1.58 ^{de}	5.39 ± 1.74 ^{abcd}
HNLC	42.63 ± 2.29 ^{bc}	23.50 ± 2.45 ^c	26.21 ± 2.44 ^{ab}	0.30 ± 0.03 ^c	11.18 ± 0.20 ^{abc}	11.71 ± 0.80 ^{ef}	6.03 ± 1.55 ^{ab}
CPPC	41.88 ± 5.82 ^c	25.00 ± 7.45 ^{bc}	22.05 ± 1.86 ^c	0.27 ± 0.03 ^c	11.06 ± 0.29 ^{abc}	10.49 ± 1.29 ^f	6.13 ± 1.31 ^a

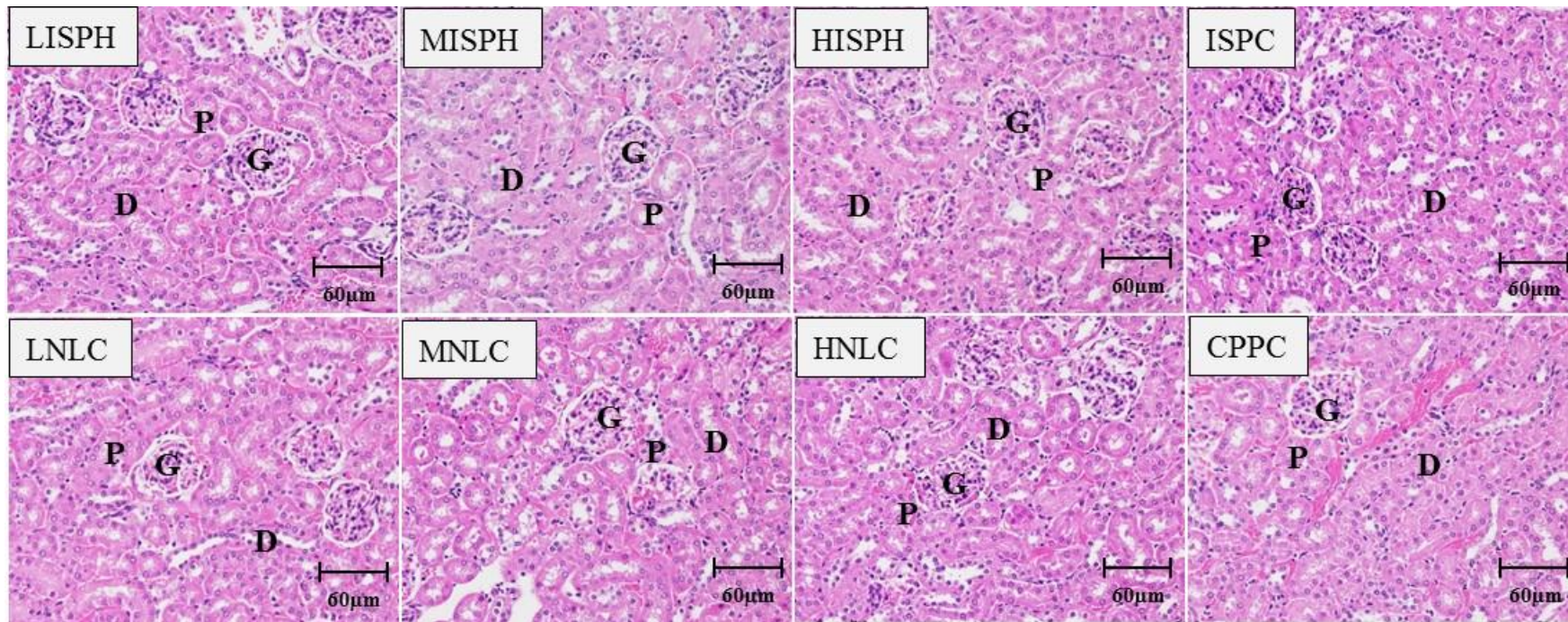
AST ; Aspartate aminotransferase. ALT; Alanine aminotransferase. BUN; Blood urea nitrogen. Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.

*Each value is expressed as mean ± SD, n=8. Mean with different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.



圖十六、餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠肝臟 H&E 組織切片染色之影響, C 為中央肝靜脈(圖中比例尺大小為 60µm, 放大倍率為 400x)

Fig 16. Effect of oral different dosage of IH and NL on liver stained by H&E of OVX mice. C indicate central vein The images were taken 400x magnification with H&E staining. Scale bars= 60µm. Abbreviations: Symbols represent ad in the Fig 4.



圖十七、餵食不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠腎臟 H&E 組織切片染色之影響。

G、P 及 D 分別表示腎絲球、近曲腎小管及遠曲腎小管(圖中比例尺大小為 60 μ m,放大倍率為 400x)

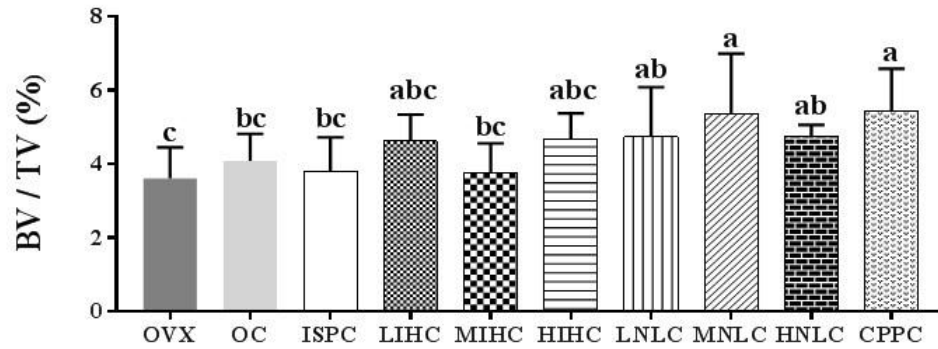
Fig 17. Effect of oral different dosage of IH and NL on kidney stained by H&E of OVX mice. G,P and D indicate glomerulus, proximal convoluted tubule and distal convoluted tubule, respectively. The images were taken 400x magnification with H&E staining. Scale bars= 60 μ m. Abbreviations: Symbols represent ad in the Fig 4.

(四)微電腦斷層掃描分析評估 IH 及 NL 對 OVX 小鼠骨小樑改善之影響

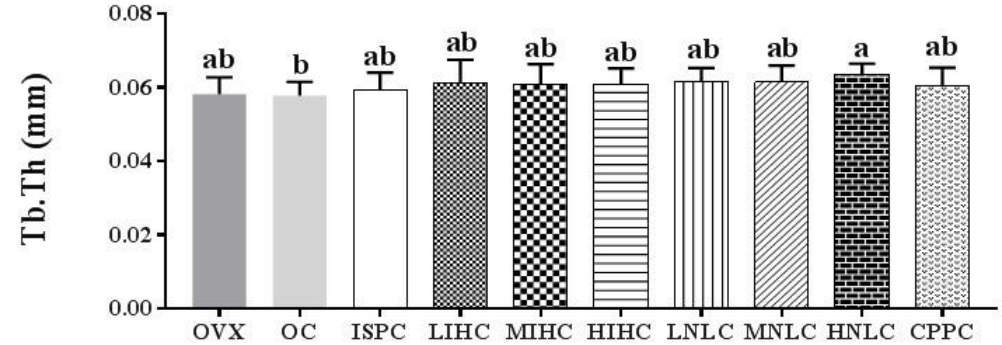
圖十八至圖二十一為飼食大豆蛋白水解物及 NL 合成胜肽對 OVX 小鼠之 3D 顯為掃描骨小樑結構之影響，圖二十二為微電腦斷層 3D 掃描之股骨結構變化分析，圖十八(A)為 BV/TV 之結果，OVX 及 OC 組之 BV/TV 分別為 $3.60 \pm 0.8\%$ 及 $4.08 \pm 0.7\%$ ，飼食低中高劑量之 IH 與 OVX 及 OC 組之間比較無顯著差異，在飼食 NL 後與 OVX 組比可顯著提升其 BV/TV 數值，其中以 MNLC 組效果最好，可提升至 $5.34 \pm 1.5\%$ ，其改善效果與正對照 CPPC 組 $5.44 \pm 1.1\%$ 無顯著差異，飼食 MNLC 後與 ISPC 組相比可顯著提升 1.25 倍，ISPC 組與 OVX 及 OC 組相比統計上無顯著差異，(B)為 Tb.Th 結果，所有組別與 OVX 組比較均無顯著差異，其中以 HNLC 組與 OC 組相比下具有最好的效果，可顯著將骨小樑厚度提升至 $0.06 \pm 0.002\text{ mm}$ ，與 OVX 組 $0.05 \pm 0.004\text{ mm}$ 相比之下無顯著差異。圖十九(A)為 Tb.N 結果，以飼食中劑量 NL 為具有最佳的效果，可有效將骨小樑數目從 OVX 組之 $0.61 \pm 0.11\text{ mm}^{-1}$ 增加至 $0.87 \pm 0.23\text{ mm}^{-1}$ ，與 CPPC 組相比無顯著差異，表示具有相同的效果，ISPC 組骨小樑數目為 $0.64 \pm 0.14\text{ mm}^{-1}$ ，與 OVX 及 OC 組相比無顯著差異，(B)為 Conn.Dn 結果，此結果所有組別均無顯著差異。圖二十(A)為 Tb.Sp 之結果，經 OVX 後會使骨小樑之間分離度增加，OVX 組及 OC 組之 Tb.Sp 分別為 0.42 ± 0.05 及 $0.38 \pm 0.03\text{ mm}^{-1}$ ，飼食不同劑量 IH 及 NL 可顯著降低 Tb.Sp，以 LIHC、MIHC、HIHC、LNLC、MNLC 效果最佳，骨小樑之間分離度分別為 0.36 ± 0.01 、 0.37 ± 0.03 、 0.36 ± 0.02 、 0.37 ± 0.02 及 $0.36 \pm 0.04\text{ mm}^{-1}$ ，ISPC 組 Tb.Sp 為 $0.40 \pm 0.04\text{ mm}^{-1}$ ，與 OVX 及 OC 組相比無顯著差異，(B)為 Tb.Pf 結果，OVX 及 OC 組之 Tb.Pf 值為 29.48 ± 3.2 及 $29.66 \pm 2.6\text{ mm}^{-1}$ ，經由飼食 MNLC 及 HNLC 可有效使 Tb.Pf 值降至 26.49 ± 2.6 及 $27.04 \pm 1.63\text{ mm}^{-1}$ 。圖二

十一(A)SMI 結果 MIHC 顯著高於其餘組別，表示 MIHC 組骨小樑結構較以桿狀結構為主，其餘組別較以板狀結構為主，(B)DA 結果中所有組別均無顯著差異。綜合以上八項骨小樑參數結果，發現餵食未水解大豆蛋白 ISPC 組與水解後 IH 及 NL 相比後對於改善骨質疏鬆症的骨小樑結構沒有正向的影響，餵食低中高劑量的 IH 在各項參數上均比未水解大豆蛋白具有較佳的效果，高劑量 IH 在 BV/TV、Tb.Th、Tb.N、Tb.Sp 及 SMI 與正對照組 CPPC 相比有相同的改善效果。餵食 NL 則可有效延緩骨質疏鬆，其中以中劑量 NL 最為有效，可顯著提升 BV/TV、TB.N 跟有效降低 Tb.Sp、Tb.Pf、SMI，與正對照組 CPPC 相比均無顯著差異，表示兩者改善骨質疏鬆症具有相同效果。圖二十為小鼠股骨以微電腦斷層掃描分析所得 3D 圖，與上述骨小樑參數結果做對照可看出餵食 IH、NL 及 CPP 與 OVX 及 OC 組相比其骨小樑緻密程度較高，新生骨多以板狀結構為主，其中以 HIHC 及 MNLC 骨質結構較為緻密且骨小樑數目為最多，表示骨吸收減緩，餵食 CPPC 組別，骨小樑數目明顯增加，使得骨小樑之間空洞減少，所以 Tb.Sp 下降，ISPC 組骨質結構較為鬆散，與 OVX、OC 組相比較無明顯變化。

(A)

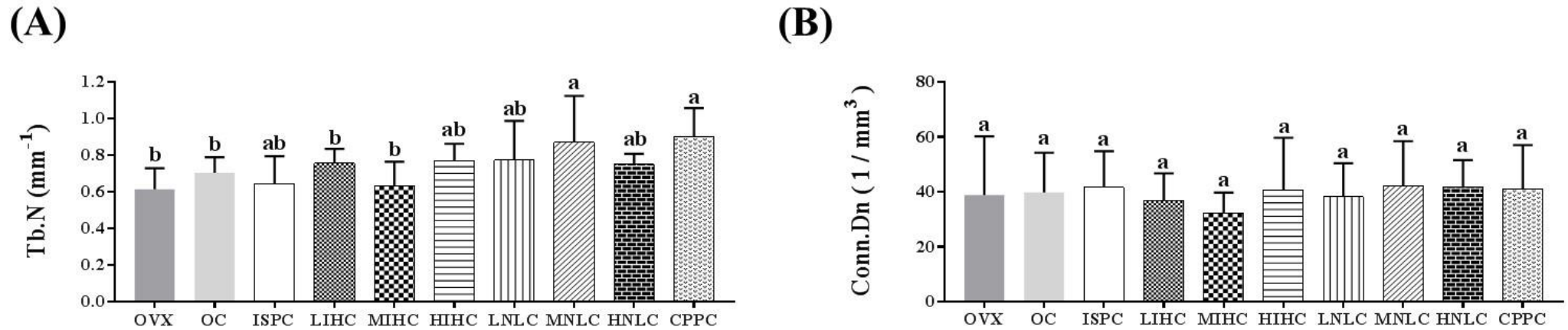


(B)



圖十八、餵食不同劑量 IH 及 NL 對誘導骨質疏鬆症小鼠 BV/TV 及 Tb.Th 之影響

Fig 18. Effect of oral different dosage of IH and NL on (A) BV/TV, trabecular bone volume/tissue volume and (B) Tb.Th, trabecular thickness. Bar represent mean \pm SD, n=8. Mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.

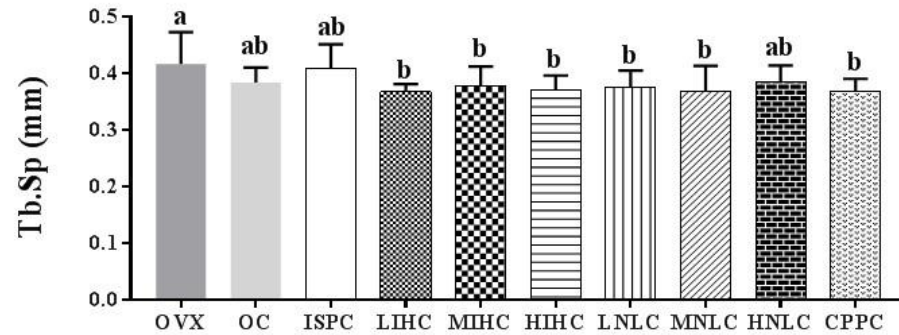


圖十九、餵食不同劑量 IH 及 NL 對誘導骨質疏鬆症小鼠 Tb.N 及 Conn.Dn 之影響

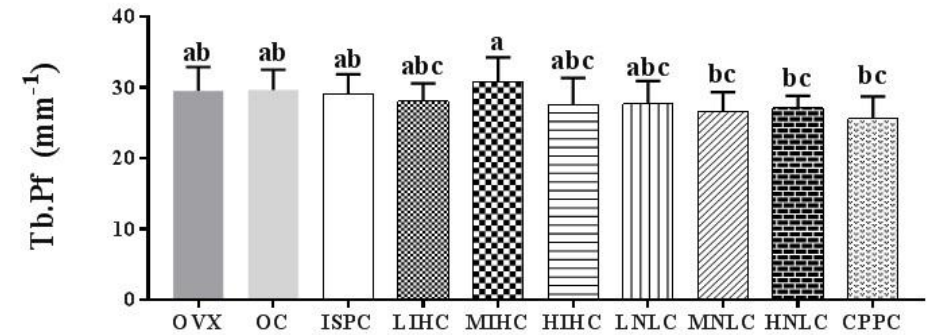
Fig 19. Effect of oral different dosage of IH and NL on (A) Tb.N, trabecular number and (B) Conn.Dn, connective density.

Bar represent mean \pm SD, n=8. Mean with different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test. Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.

(A)



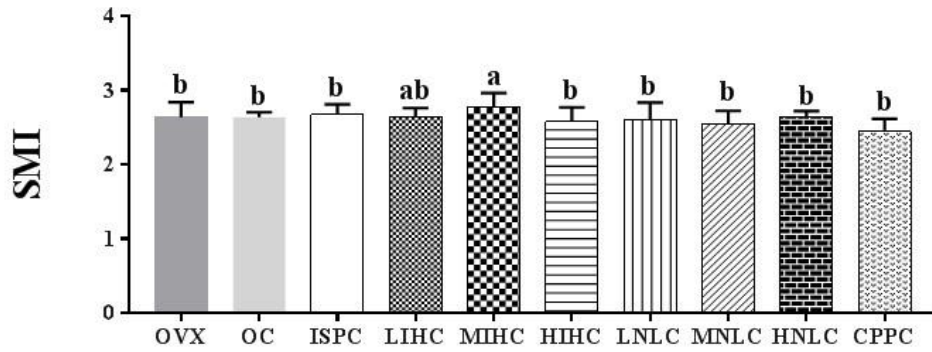
(B)



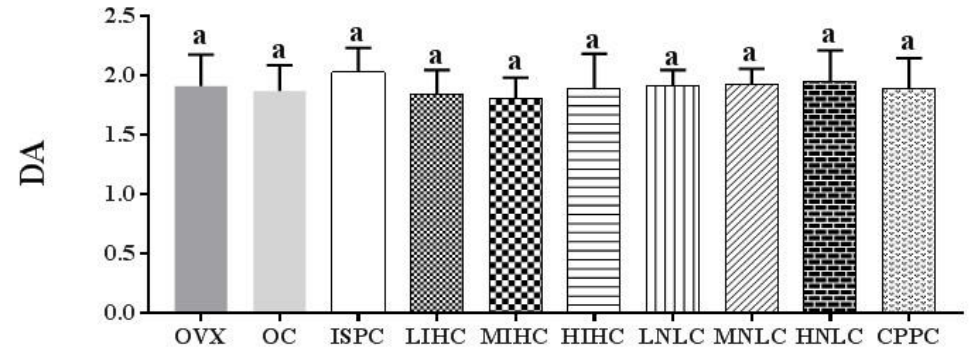
圖二十、餵食不同劑量 IH 及 NL 對誘導骨質疏鬆症小鼠 Tb.Sp 及 Tb.Pf 之影響

Fig 20. Effects of oral different dosage of IH and NL on (A) Tb.Sp, trabecular separation and (B) Tb.Pf, trabecular pattern factor. Bar represent mean \pm SD, n=8. Mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.

(A)

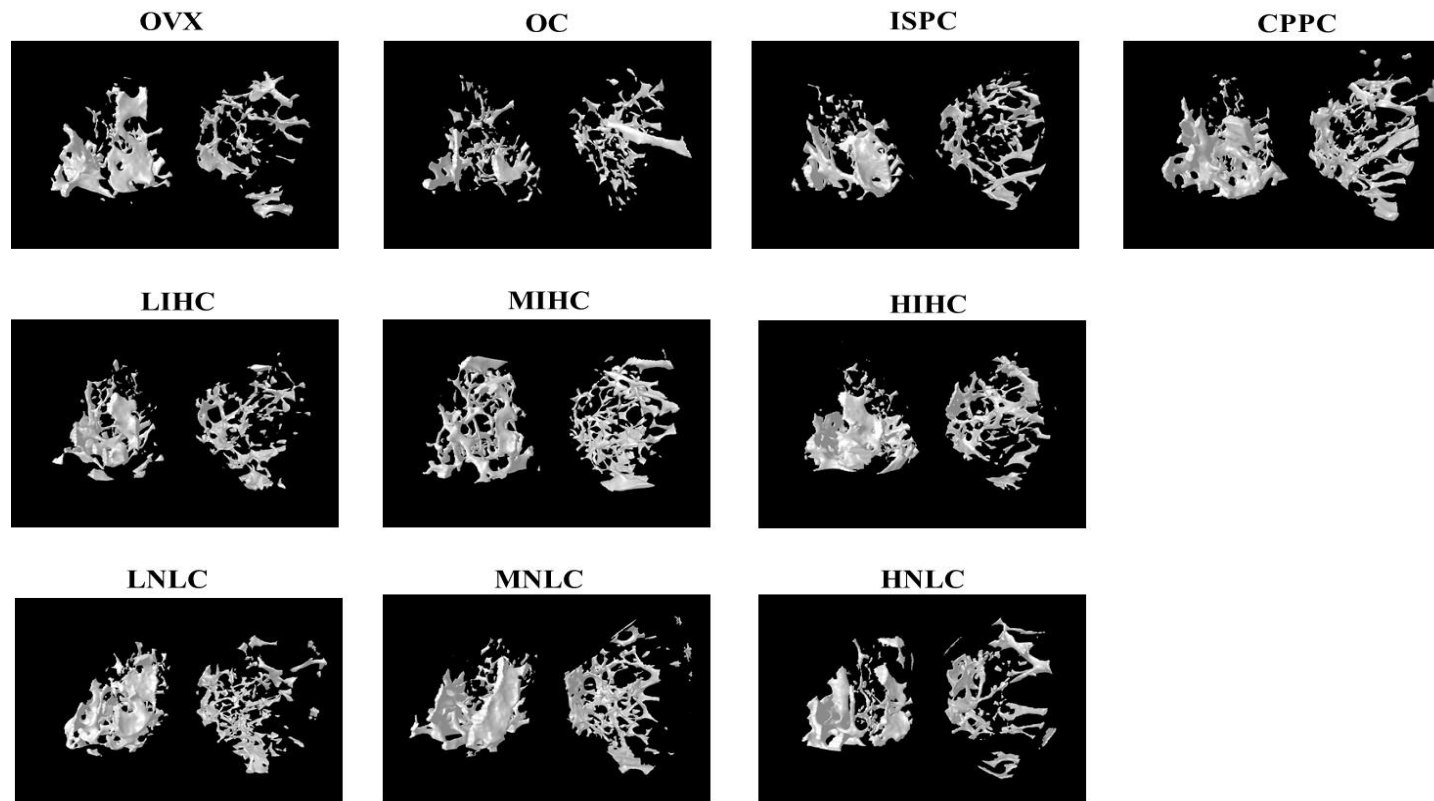


(B)



圖二十一、餵食不同劑量 IH 及 NL 對誘導骨質疏鬆症小鼠 SMI 及 DA 之影響

Fig 21. Effects of oral different dosage of IH and NL on (A) SMI, structure model index and (B) DA, degree of anisotropy . Bar represent mean \pm SD, n=8. Mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.



圖二十二、3D 微電腦斷層掃瞄分析不同劑量 IH 及 NL 對 OVX 小鼠股骨骨質之影響

Fig 22. A three-dimensional tomographic rendering of OVX mice femur reveals the complexity of the bone structure on effect of different dosage of IH and NL. Abbreviations: Symbols represent as in the Fig 4.

伍、 結論

本研究利用 Trypsin 水解分離大豆蛋白製備 IH 及委外合成具促鈣吸收之胜肽序列 NLQGENEEEDSGAIVTVK(NL)，探討其對 C57BL/6J 骨質疏鬆雌性小鼠之改善作用。經由 OVX 後 B6 小鼠體重及脂肪量均較未手術組顯著增加，脂肪量亦增加，子宮則因雌激素的減少引起萎縮。血清中肝腎指數及組織切片染色結果中表示口服碳酸鈣、IH 及 NL 皆不會對腎臟及肝臟造成病變，單純口服碳酸鈣對於小鼠血清中骨鈣素無顯著影響，餵食不同劑量 NL 會使血清中骨鈣素含量顯著提升，表示小鼠體內成骨細胞活動較為活躍。

配合微電腦斷層掃描股骨骨小樑結構參數分析結果，健康小鼠口服碳酸鈣後可有效增加骨小樑體積比及骨小樑隻數，OVX 後小鼠骨小樑體積及骨小樑隻數均會下降，骨小樑之間距離則會增加，使得整體骨小樑結構較為鬆散空洞較多，另外餵食碳酸鈣對於改善 OVX 小鼠骨小樑結構並無顯著效果。餵食未水解大豆蛋白 ISPC 組，與餵食 IH 及 NL 相比，對於改善骨小樑結構亦無顯著效果，餵食不同劑量 IH 及 NL 可有效使骨小樑間距離降低 1.13 倍，高劑量 IH 及中劑量 NL 可分別有效使骨小樑體積增加至 $4.68\pm 0.6\%$ 及 $5.34\pm 1.5\%$ ，使骨小樑隻數增加至 0.77 ± 0.08 mm 及 0.86 ± 0.23 mm，並有效預防骨小樑由板狀向桿狀變化，其新生骨以板狀結構為主，骨結構較為緻密，與正控制組酪蛋白磷酸胜肽具有相似的改善骨質疏鬆症效果。

綜合上述結果，單純口服碳酸鈣可有效增加健康小鼠骨小樑體積比及隻數，但對於骨質疏鬆症小鼠之骨小樑結構無明顯改善現象，水解後的分離大豆蛋白及其胜肽序列均可有效的促進骨鬆 C57/BL6 小鼠體內的鈣吸收，並可有效改善骨小樑相關參數，對於因更年期導致雌激素缺乏所引起的骨質疏鬆症有明顯的緩解效果。



陸、 參考文獻

- 中華民國內政部戶政司。(2018)。各縣市老年人口佔總人口比率。
<https://www.ris.gov.tw/app/portal/346>
- 呂明興。(2015)。Pepsin-大豆蛋白水解物中免疫調節肽之純化及鑑定。東海大學碩士論文。台中。台灣。
- 林天送。(2012)。大豆素食者的營養補品。健康世界(313), p.65-68。
- 林文彬。(2005)。骨質疏鬆與鈣(上)。台灣中醫臨床醫學雜誌(11).2 p.135-141。
- 周佑星。(2018)。蛋白質酵素水解物中具鈣螯合能力胜肽之分離及鑑定。東海大學碩士論文。台中。台灣。
- 招有容。(2016)。蛋白質水解物中調節血糖肽脂純化及鑑定。東海大學碩士論文。台中。台灣。
- 施映竹。(2018)。具鈣螯合能力肽對於 CaCo-2 細胞和 HT-29 細胞之促進鈣吸收機制。東海大學碩士論文。台中。台灣。
- 楊南屏, 楊榮森 & 周碧瑟。(2008)。提早因應高齡化社會的特殊醫療保健需求: 以骨質疏鬆症為例。台灣公共衛生雜誌,27(3), 181-197。
- 趙利,李雁群,余世望。(1997)。試論食品工業中蛋白質酶水解產物生產。食品研究與開發,18(4)8-10。
- 鄭冬梅, 孔保華, 李升福。(2002)。玉米蛋白及其水解肽的研究動態。食品與發酵工業。28(11), 55。
- 蔣慎思。(2011)。基因轉殖乳酸球菌 NZ9000/pNZPNK 之致敏性及副乾酪乳酸桿菌 NTU101 與胚芽乳酸桿菌 NTU102 益生功能之評估。台灣大學博士論文。台北。台灣。
- 衛生福利部國民健康署。(2018)。慢性疾病防治組。認識你的腎臟。
<https://www.hpa.gov.tw/Pages/Detail.aspx?nodeid=635&pid=1198>
- 衛生福利部國民健康署年報。(2018)。
<https://www.hpa.gov.tw/Pages/Detail.aspx?nodeid=3801&pid=10284>
- 賴冠達。(2011)。利用摘除卵巢小鼠為動物模式評估克弗爾延緩骨質流失之功效。大葉大學碩士論文。彰化。台灣。
- 蘇暉婷。(2015)。Alcalase-馬鈴薯蛋白水解物中促脂解肽之純化及鑑定。東海大學碩士論文。台中。台灣。
- Aged-C57BL/6J-physiological-data-summary. (2018).The Jackson Laboratory.
<https://www.jax.org/strain/000664>
- Adluri, R. S., Zhan, L., Bagchi, M., Maulik, N., & Maulik, G. (2010). Comparative effects of a novel plant-based calcium supplement with two

- common calcium salts on proliferation and mineralization in human osteoblast cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 340(1-2), 73-80.
- Bao, X. L., Lv, Y., Yang, B. C., Ren, C. G., & Guo, S. T. (2008). A study of the soluble complexes formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates. *Journal of food science*, 73(3), 117-121.
- Bhadricha, H., Khatkhatay, M. I., & Desai, M. (2019). Development of an in house ELISA for human intact osteocalcin and its utility in diagnosis and management of osteoporosis. *Clinica Chimica Acta*, 489, 117-123.
- Bhat, Z., Kumar, S., & Bhat, H. F. (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of food science and technology*, 52(9), 5377-5392.
- Bhattarai, T., Bhattacharya, K., Chaudhuri, P., & Sengupta, P. (2014). Correlation of common biochemical markers for bone turnover, serum calcium, and alkaline phosphatase in post-menopausal women. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 21(1), 58.
- Boonen, S., & Singer, A. J. (2008). Osteoporosis management: impact of fracture type on cost and quality of life in patients at risk for fracture I. *Current medical research and opinion*, 24(6), 1781-1788.
- Brickley, M., & Ives, R. (2010). *The bioarchaeology of metabolic bone disease*: Elsevier.
- Bronner, F., & Pansu, D. (1999). Nutritional aspects of calcium absorption. *The Journal of nutrition*, 129(1), 9-12.
- Centeno, V., de Barboza, G. D., Marchionatti, A., Rodríguez, V., & de Talamoni, N. T. (2009). Molecular mechanisms triggered by low-calcium diets. *Nutrition research reviews*, 22(2), 163-174.
- Chalamaiah, M., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food chemistry*, 135(4), 3020-3038.
- Chalamaiah, M., Rao, G. N., Rao, D. G., & Jyothirmayi, T. (2010). Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. *Food chemistry*, 120(3), 652-657.
- Chalamaiah, M., Yu, W., & Wu, J. (2017). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food chemistry*.
- Chappard, D., Baslé, M.-F., Legrand, E., & Audran, M. (2008). Trabecular bone microarchitecture: a review. *Morphologie*, 92(299), 162-170.
- Charoenphun, N., Cheirsilp, B., Sirinupong, N., & Youravong, W. (2013). Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*)

- protein hydrolysate. *European Food Research and Technology*, 236(1), 57-63.
- Chen, D., Mu, X., Huang, H., Nie, R., Liu, Z., & Zeng, M. (2014). Isolation of a calcium-binding peptide from tilapia scale protein hydrolysate and its calcium bioavailability in rats. *Journal of Functional Foods*, 6, 575-584.
- Chen, F.-P., Huang, T.-S., Fu, T.-S., Sun, C.-C., Chao, A.-S., & Tsai, T.-L. (2018). Secular trends in incidence of osteoporosis in Taiwan: A nationwide population-based study. *biomedical journal*, 41(5), 314-320.
- Chen, M., Qiao, H., Su, Z., Li, H., Ping, Q., & Zong, L. (2014). Emerging therapeutic targets for osteoporosis treatment. *Expert opinion on therapeutic targets*, 18(7), 817-831.
- Chen, Y., Naik, S. G., Krzystek, J., Shin, S., Nelson, W. H., Xue, S., . . . Liu, A. (2012). Role of calcium in metalloenzymes: Effects of calcium removal on the axial ligation geometry and magnetic properties of the catalytic diheme center in MauG. *Biochemistry*, 51(8), 1586-1597.
- Cho, D.-Y., Jo, K., Cho, S. Y., Kim, J. M., Lim, K., Suh, H. J., & Oh, S. (2014). Antioxidant effect and functional properties of hydrolysates derived from egg-white protein. *Korean journal for food science of animal resources*, 34(3), 362.
- Clark, V. L., & Kruse, J. A. (1990). Clinical methods: the history, physical, and laboratory examinations. *Jama*, 264(21), 2808-2809.
- Curate, F. (2014). Osteoporosis and paleopathology: a review. *Journal of anthropological sciences= Rivista di antropologia: JASS*, 92, 119-146.
- Daengprok, W., Garnjanagoonchorn, W., Naivikul, O., Pornsinlpatip, P., Issigonis, K., & Mine, Y. (2003). Chicken eggshell matrix proteins enhance calcium transport in the human intestinal epithelial cells, Caco-2. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(20), 6056-6061.
- Dallas, S. L., Prideaux, M., & Bonewald, L. F. (2013). The osteocyte: an endocrine cell... and more. *Endocrine reviews*, 34(5), 658-690.
- De Villiers, T., & Stevenson, J. (2012). The WHI: the effect of hormone replacement therapy on fracture prevention. *Climacteric*, 15(3), 263-266.
- Dede, A. D., & Callan, M. (2018). Treatment of osteoporosis: whom, how and for how long? *British Journal of Hospital Medicine*, 79(5), 259-264.
- Faccio, R., Novack, D. V., Zallone, A., Ross, F. P., & Teitelbaum, S. L. (2003). Dynamic changes in the osteoclast cytoskeleton in response to growth factors and cell attachment are controlled by $\beta 3$ integrin. *J Cell Biol*, 162(3), 499-509.

- García, M., Puchalska, P., Esteve, C., & Marina, M. (2013). Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, *106*, 328-349.
- Giromini, C., Fekete, Á. A., Givens, D. I., Baldi, A., & Lovegrove, J. A. (2017). Short-communication: a comparison of the in vitro angiotensin-1-converting enzyme inhibitory capacity of dairy and plant protein supplements. *Nutrients*, *9*(12), 1352.
- Golob, A. L., & Laya, M. B. (2015). Osteoporosis: screening, prevention, and management. *Medical Clinics*, *99*(3), 587-606.
- Guéguen, L., & Pointillart, A. (2000). The bioavailability of dietary calcium. *Journal of the American College of Nutrition*, *19*(sup2), 119S-136S.
- Hall, P., & Cash, J. (2012). What is the real function of the Liver 'function' tests? *The Ulster medical journal*, *81*(1), 30.
- Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current opinion in biotechnology*, *18*(2), 163-169.
- He, X. Q., Cao, W. H., Pan, G. K., Yang, L., & Zhang, C. H. (2015). Enzymatic hydrolysis optimization of *Paphia undulata* and lymphocyte proliferation activity of the isolated peptide fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(7), 1544-1553.
- Heaney, R. P., Weaver, C. M., & Fitzsimmons, M. L. (1991). Soybean phytate content: effect on calcium absorption. *The American journal of clinical nutrition*, *53*(3), 745-747.
- Hinrichsen, G., Harte, B. R., Selke, S. E., Drzal, L. T., Misra, M., & Mohanty, A. K. (2005). Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites: An Introduction *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites* (pp. 17-51): CRC Press.
- Huang, G., Ren, L., & Jiang, J. (2011). Purification of a histidine-containing peptide with calcium binding activity from shrimp processing byproducts hydrolysate. *European Food Research and Technology*, *232*(2), 281-287.
- Ja, K., Oden, A., Mccloskey, E., Johansson, H., & Wahl, D. (2012). IOF Working Group on Epidemiology and Quality of Life. A systematic review of hip fracture incidence and probability of fracture worldwide. *Osteoporos Int*, *23*, 2239-2256.
- Jiang, B., & Mine, Y. (2001). Phosphopeptides derived from hen egg yolk phosvitin: effect of molecular size on the calcium-binding properties. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *65*(5), 1187-1190.

- Jin, Y.-G., Fu, W.-W., & Ma, M.-H. (2011). Preparation and structure characterization of soluble bone collagen peptide chelating calcium. *African Journal of Biotechnology*, *10*(50), 10204-10211.
- Jung, W.-K., & Kim, S.-K. (2007). Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysates of hoki (*Johnius belengerii*) frame. *European Food Research and Technology*, *224*(6), 763-767.
- Kanis, J., Burlet, N., Cooper, C., Delmas, P., Reginster, J.-Y., Borgstrom, F., & Rizzoli, R. (2008). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis international*, *19*(4), 399-428.
- Katono, T., Kawato, T., Tanabe, N., Suzuki, N., Iida, T., Morozumi, A., . . . Maeno, M. (2008). Sodium butyrate stimulates mineralized nodule formation and osteoprotegerin expression by human osteoblasts. *Archives of oral biology*, *53*(10), 903-909.
- Khosla, S., Bilezikian, J. P., Dempster, D. W., Lewiecki, E. M., Miller, P. D., Neer, R. M., Potts, J. T. (2012). Benefits and risks of bisphosphonate therapy for osteoporosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *97*(7), 2272-2282.
- Kim, S.-K., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, *2*(1), 1-9.
- Kitts, D. D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current pharmaceutical design*, *9*(16), 1309-1323.
- Klein-Nulend, J., van Oers, R. F., Bakker, A. D., & Bacabac, R. G. (2015). Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis. *Journal of biomechanics*, *48*(5), 855-865.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, *16*(9), 945-960.
- Kumagai, H., Koizumi, A., Sato, N., Ishikawa, Y., Suda, A., Sakurai, H., & Kumagai, H. (2004). Effect of phytate-removal and deamidation of soybean proteins on calcium absorption in the in situ rats. *Biofactors*, *22*(1-4), 21-24.
- Liu, W.-Y., Lu, J., Gao, F., Gu, R.-Z., Lin, F., Ren, D.-F., & Cai, M.-Y. (2015). Preparation, characterization and identification of calcium-chelating Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ossein oligopeptides. *European Food Research and Technology*, *241*(6), 851-860.

- Lv, Y., Liu, H., Ren, J., Li, X., & Guo, S. (2013). The positive effect of soybean protein hydrolysates—calcium complexes on bone mass of rapidly growing rats. *Food & function*, 4(8), 1245-1251.
- Madimenos, F. C. (2015). An evolutionary and life-history perspective on osteoporosis. *Annual Review of Anthropology*, 44, 189-206.
- Maquer, G., Musy, S. N., Wandel, J., Gross, T., & Zysset, P. K. (2015). Bone volume fraction and fabric anisotropy are better determinants of trabecular bone stiffness than other morphological variables. *Journal of bone and mineral research*, 30(6), 1000-1008.
- Melton III, L. J., Chrischilles, E. A., Cooper, C., Lane, A. W., & Riggs, B. L. (1992). Perspective how many women have osteoporosis? *Journal of bone and mineral research*, 7(9), 1005-1010.
- Mesias, M., Seiquer, I., & Navarro, M. P. (2011). Calcium nutrition in adolescence. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(3), 195-209.
- Mizoguchi, T., Pinho, S., Ahmed, J., Kunisaki, Y., Hanoun, M., Mendelson, A., . . . Frenette, P. S. (2014). Osterix marks distinct waves of primitive and definitive stromal progenitors during bone marrow development. *Developmental cell*, 29(3), 340-349.
- Mok, H., Feng, J., Hu, W., Wang, J., Cai, J., & Lu, F. (2018). Decreased serum estrogen improves fat graft retention by enhancing early macrophage infiltration and inducing adipocyte hypertrophy. *Biochemical and biophysical research communications*, 501(1), 266-272.
- Moseley, K. F., Dobrosielski, D. A., Stewart, K. J., De Beur, S. M. J., & Sellmeyer, D. E. (2011). Lean mass and fat mass predict bone mineral density in middle-aged individuals with noninsulin-requiring type 2 diabetes mellitus. *Clinical endocrinology*, 74(5), 565-571.
- Nill, K. (2016). Soy Beans: Properties and Analysis.
- Noman, A., Xu, Y., AL-Bukhaiti, W. Q., Abed, S. M., Ali, A. H., Ramadhan, A. H., & Xia, W. (2018). Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. *Process Biochemistry*, 67, 19-28.
- Ott, S. M. (2004). Bone Remodeling, Dynamics of.
- Pan, D., Cao, J., Guo, H., & Zhao, B. (2012). Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate. *Food chemistry*, 130(1), 121-126.
- Pan, D., Lu, H., & Zeng, X. (2013). A newly isolated Ca binding peptide from

- whey protein. *International journal of food properties*, 16(5), 1127-1134.
- Parfitt, A. M. (2002). Misconceptions (2): turnover is always higher in cancellous than in cortical bone. *Bone*, 30(6), 807-809.
- Penido, M. G. M., & Alon, U. S. (2012). Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatric nephrology*, 27(11), 2039-2048.
- Perego, S., Del Favero, E., De Luca, P., Dal Piaz, F., Fiorilli, A., & Ferraretto, A. (2015). Calcium bioaccessibility and uptake by human intestinal like cells following in vitro digestion of casein phosphopeptide–calcium aggregates. *Food & function*, 6(6), 1796-1807.
- Piao, Y., Liu, Y., & Xie, X. (2013). Change trends of organ weight background data in Sprague Dawley rats at different ages. *Journal of toxicologic pathology*, 26(1), 29-34.
- Pokora, M., Eckert, E., Zambrowicz, A., Bobak, Ł., Szoltyś, M., Dąbrowska, A., Trziszka, T. (2013). Biological and functional properties of proteolytic enzyme-modified egg protein by-products. *Food science & nutrition*, 1(2), 184-195.
- Quaglia, G., & Orban, E. (1990). Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates. *Journal of food science*, 55(6), 1571-1573.
- Ralston, S. H. (2017). Bone structure and metabolism. *Medicine*, 45(9), 560-564.
- Recio, R. T., Guerra, N. P., Torrado, A., & Skibsted, L. H. (2019). Interaction between calcium and casein hydrolysates: Stoichiometry, binding constant, binding sites and thermal stability of casein phosphopeptide complexes. *International Dairy Journal*, 88, 25-33.
- Recker, R., Lappe, J., Davies, K. M., & Heaney, R. (2004). Bone remodeling increases substantially in the years after menopause and remains increased in older osteoporosis patients. *Journal of bone and mineral research*, 19(10), 1628-1633.
- Rerat, A., Nunes, C. S., Mendy, F., & Roger, L. (1988). Amino acid absorption and production of pancreatic hormones in non-anaesthetized pigs after duodenal infusions of a milk enzymic hydrolysate or of free amino acids. *British journal of Nutrition*, 60(1), 121-136.
- Sato, R., Nogghi, T., & Naito, H. (1986). Casein Phosphopeptide (CPP) Enhances Calcium Absorption from the Ligated Segment of Rat Small Intestine. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 32(1), 67-76.
- Seeman, E. (2003). The structural and biomechanical basis of the gain and loss of bone strength in women and men. *Endocrinology and Metabolism Clinics*,

32(1), 25-38.

- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91(4), 914-931.
- Song, R., Zhang, K.-q., & Wei, R.-b. (2016). In vitro antioxidative activities of squid (*Ommastrephes bartrami*) viscera autolysates and identification of active peptides. *Process Biochemistry*, 51(10), 1674-1682.
- Stránský, M., & Rysava, L. (2009). Nutrition as prevention and treatment of osteoporosis. *Physiol Res*, 58(Suppl 1), S7-S11.
- Sun, N., Wu, H., Du, M., Tang, Y., Liu, H., Fu, Y., & Zhu, B. (2016). Food protein-derived calcium chelating peptides: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 58, 140-148.
- Suzuki, Y., Landowski, C. P., & Hediger, M. A. (2008). Mechanisms and regulation of epithelial Ca²⁺ absorption in health and disease. *Annu. Rev. Physiol.*, 70, 257-271.
- Tian, H., Guo, G., Fu, X., Yao, Y., Yuan, L., & Xiang, A. (2018). Fabrication, properties and applications of soy-protein-based materials: A review *International journal of biological macromolecules*.
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., & Vioque, J. (2011). Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food chemistry*, 129(2), 485-490.
- Vavrusova, M., & Skibsted, L. H. (2014). Calcium nutrition. Bioavailability and fortification. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 1198-1204.
- Wang, L., Chen, S., Liu, R., & Wu, H. (2012). A novel hydrolytic product from flesh of *Macra veneriformis* and its bioactivities in calcium supplement. *Journal of Ocean University of China*, 11(3), 389-396.
- Wark, J. D. (1996). Osteoporotic fractures: background and prevention strategies. *Maturitas*, 23(2), 193-207.
- Wasserman, R. (2004). Vitamin D and the dual processes of intestinal calcium absorption. *The Journal of nutrition*, 134(11), 3137-3139.
- Weaver, C. M., & Liebman, M. (2002). Biomarkers of bone health appropriate for evaluating functional foods designed to reduce risk of osteoporosis. *British journal of Nutrition*, 88(S2), S225-S232.
- Weaver, C. M., Martin, B. R., Ebner, J. S., & Krueger, C. A. (1987). Oxalic acid decreases calcium absorption in rats. *The Journal of nutrition*, 117(11), 1903-1906.
- Wright, N. C., Looker, A. C., Saag, K. G., Curtis, J. R., Delzell, E. S., Randall, S.,

- & Dawson-Hughes, B. (2014). The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. *Journal of bone and mineral research*, 29(11), 2520-2526.
- Ying, L., Bao, X. L., Yang, B. C., Ren, C. G., & Guo, S. T. (2008). Effect of soluble soybean protein hydrolysate-calcium complexes on calcium uptake by Caco-2 cells. *Journal of food science*, 73(7), H168-H173.
- Zhao, L., Huang, S., Cai, X., Hong, J., & Wang, S. (2014). A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 10, 46-53.
- Zhao, N., Hu, J., Hou, T., Ma, Z., Wang, C., & He, H. (2014). Effects of desalted duck egg white peptides and their products on calcium absorption in rats. *Journal of Functional Foods*, 8, 234-242.
- Zhong, L. R., Estes, S., Artinian, L., & Rehder, V. (2013). Nitric oxide regulates neuronal activity via calcium-activated potassium channels. *PloS one*, 8(11), e78727.
- Zhou, B. O., Yue, R., Murphy, M. M., Peyer, J. G., & Morrison, S. J. (2014). Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell stem cell*, 15(2), 154-168.
- Zhou, Y., Xue, S., & Yang, J. J. (2013). Calciomics: integrative studies of Ca²⁺-binding proteins and their interactomes in biological systems. *Metallomics*, 5(1), 29-42.

柒、附錄

附錄一、分離大豆蛋白規格表

JIU PU ENTERPRISE CO.,LTD.

No.273, Ta Fu Road, Shen Kang, Taichung,
Taiwan, R.O.C.

TEL: 886-4-25625305 FAX: 886-4-25616707

TEL: 0937-230166

CERTIFICATE OF ANALYSIS AND COMPOSITION

PRODUCT Soy protein isolate A702-11 大豆分離蛋白

DATE 2015.09.12

SPECIFICATION	RESULT
Moisture content	6.15%
Protein(dry basis)	90.37%
Ash (dry basis)	4.91%
Crude Fiber(dry basis)	0.27%
Total Plate count	770cfu/g
Coliform(MPN/100g)	<30
Salmonella	Negative

附錄二、NLQGENEEEDSGAIVTVK(NL)合成胜肽之規格表

Peptide Data Sheet		
NAME : NL		
SEQUENCE : NLQGE NEEDED SGAIV TVK		
AVERAGE MASS : 1932.04		
AMOUNT DELIVERED : 6g		
Tests	Specifications	Results
Appearance	White to off white powder	Consistent
Purity(HPLC)	>98%	98.87%
Mass	Consistent	Consistent
Remarks: The accuracy of observed mass is + 0.1%. The purity analyzed by HPLC has a + 2% deviation for peptide < or = 98%. Not for human use. Research purpose only		

附錄三、酪蛋白磷酸水解物規格表



HanSient

豐富生命，開啟淨化身心靈的密碼

漢馨科技有限公司 Han-Sient Trading Co., Ltd.

Specification

Page 1 of 1

Hydrolysed Casein Protein

酪蛋白水解物

Origin : New Zealand

ITEMS	SPECIFICATION
Protein Dry Basia	>90.0 %m/m
Fat	<1.5 %m/m
Moisture	<5.0 %m/m
Ash	<5.5 %m/m
Lactose Monohydrate	<0.5 %m/m
pH	6.5~7.5
Casein Phosphopeptide	>15.0 %CPP m/m
Degree of Hydrolysis	9.0~11.0 %DH
Physical Properties	
Scorched Particles	A/50g
Bulk Density	0.35~0.45g/ml
Heavy Metals (as Lead)	<5.0mg/kg
Arsenic	<0.1mg/kg
Microbiological	
Aerobic Plate Count	<5,000cfu/g
Coliforms	Not Detected/g
E.coli	Not Detected/g
Yeasts and Moulds	<50cfu/g
Coagulase Positive Staoh.aureus	Not Detected/g
Salmonella	Not Detected/750g
Listeria	Not Detected/25g



附錄四、碳酸鈣規格表

SPECIFICATIONS

GENERAL INFORMATION

Product Name	COLLOCALSO-WB
Appearance	Calcium Carbonate
Ingredients	White powder
GMO information	CaCO ₃ 100%
Allergen	Non-GMO
Packages	Allergen-free
	Three-layer, Kraft paper bag
	with internal Polyethylene bag of 25kgs

CHEMICAL COMPONENTS

<Test Items>	<Specifications>	<Test Methods>
Hydrochloric Acid-Insoluble Substances	0.20% Max	JAPAN'S SPECIFICATIONS AND STANDARDS FOR FOOD ADDITIVES.
Free Alkali	No pink color develops	ditto
Heavy metal (as Pb)	20 μ g/g Max	ditto
Alkali Metals & Magnesium	1.0% Max	ditto
Barium (as Ba)	0.030% Max	ditto
Arsenic (as As ₂ O ₃)	4.0ppm Max	ditto
Loss on Drying	2.0% Max	ditto
Assay	98.0~102.0%	ditto
Ave. Particle Size	2.5 \pm 0.2 μ m	Our testing method
pH	9.8 \pm 0.5	ditto
Whiteness	95 Min	ditto
Sieve Residue(45 μ m)	0.1% Max	ditto
Fluoride (※)	0.005% Max	Distillation
Lead (※)	10ppm Max	Atomic absorption

※These specifications are effective only if Lot No. with "T"

附錄五、CON, CC, OVX 個別小鼠之組織病理變化

Group/ organ	Histopathological findings	Animal code											
		CON											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kidney													
	Cast, tubule, multifocal	2						1	2	1	1		
Liver													
	Accumulation, glycogen, diffuse	4	4	4	4	3	3	3	4	4	4	4	3
	Necrosis, focal		1										
Group/ organ	Histopathological findings	Animal code											
		CC											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kidney													
	Cast, tubule, multifocal		1					1	2	2	2	1	
Liver													
	Accumulation, glycogen, diffuse	4	4	3	4	4	3	3	3	3	3	3	3
	Necrosis, focal					2							
Group/ organ	Histopathological findings	Animal code											
		OVX											
		1	4	5	6	8	9	10	11				
Kidney													
	Cast, tubule, multifocal	1	1			2			2				
	Infiltration, mononuclear cell, focal												
Liver													
	Accumulation, glycogen, diffuse	3	3	3	2	4	3	3	3				
	Hematopoiesis, multifocal	2											

:- No effect.

¹: Degree of lesions was graded from one to five depending on severity: 1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1-25%); 3 = moderate (26-50%); 4 = moderate/severe (51-75%); 5 = severe/high (76-100%).

附錄六、OC, LIHC, MIHC 個別小鼠之組織病理變化

Group/ organ	Histopathological findings	Animal code											
		OC											
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
Kidney		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Cast, tubule, multifocal					1		2		2	2		
Liver													
	Accumulation, glycogen, diffuse	4	2	3	3	2	3	3	2	3	2		
	Necrosis, focal			1									
Group/ organ	Histopathological findings	Animal code											
		LIHC											
		-	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kidney				-			-						
	Cast, tubule, multifocal	2	1		1	2		1	2	1	1		
Liver													
	Accumulation, glycogen, diffuse	3	3	2	2	2	2	2	3	3	3	2	
	Necrosis, focal		1					1	1				
	Infiltration, mononuclear cell, focal	2											
Group/ organ	Histopathological findings	Animal code											
		MIHC											
		-	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Kidney		-		-			-						
	Cast, tubule, multifocal				1				2	1			
	Cyst, tubule, focal							2					
	Infiltration, mononuclear cell, focal					2		2		2			
	Pyelonephritis, diffuse		4										
Liver					-								
	Accumulation, glycogen, diffuse	3		2		2	2		2		2		
	Necrosis, focal	1	2	1			1	3	1		1		
	Infiltration, mononuclear cell, focal					3				2			

-: No effect.

¹: Degree of lesions was graded from one to five depending on severity: 1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1-25%); 3 = moderate (26-50%); 4 = moderate/severe (51-75%); 5 = severe/high (76-100%).

附錄七、HIHC,ISPC, LNLC 個別小鼠之組織病理變化

Group/ organ	Histopathological findings	Animal code											
		HIHC											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	11		
Kidney				-		-	-	-		-			
	Cast, tubule, multifocal	2	1					2	2				
	Infiltration, mononuclear cell, focal				2			2	2				
Liver				-	-	-	-	-					
	Accumulation, glycogen, diffuse	2	2						2	2			
	Necrosis, focal	1	1										
Group/ organ	Histopathological findings	Animal code											
		ISPC											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	11		
Kidney			-		-	-							
	Cast, tubule, multifocal			2				2	2	2			
	Infiltration, mononuclear cell, focal	2						1					
Liver			-	-		-	-						
	Accumulation, glycogen, diffuse	2				2			4	2			
	Necrosis, focal	1			1								
Group/ organ	Histopathological findings	Animal code											
		LNLC											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kidney			-	-	-	-						-	
	Cast, tubule, multifocal	2				2		1				1	
	Infiltration, mononuclear cell, focal												
Liver			-	-	-	-	-					-	
	Necrosis, focal	1							1	2			
	Infiltration, mononuclear cell, focal											2	

-: No effect.

¹: Degree of lesions was graded from one to five depending on severity: 1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1-25%); 3 = moderate (26-50%); 4 = moderate/severe (51-75%); 5 = severe/high (76-100%).

附錄八、MNLC,HNLC,CPPC 個別小鼠之組織病理變化

Group/ organ	Histopathological findings	Animal code											
		MNLC											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kidney			-					-	-				
	Cast, tubule, multifocal	2		1	2	2			2		2	2	1
	Infiltration, mononuclear cell, focal			2	2								
Liver		-	-	-		-		-	-	-			-
	Necrosis, focal				1		1				2		
	Infiltration, mononuclear cell, focal											2	
Group/ organ	Histopathological findings	Animal code											
		HNLC											
		2	3	5	6	7	8	9	10	11	12		
Kidney					-	-				-			
	Cast, tubule, multifocal	2	1	1				2			1		
	Infiltration, mononuclear cell, focal	1					2	2		2			
Liver		-	-	-	-	-				-	-		-
	Necrosis, focal						1				1		
	Infiltration, mononuclear cell, focal							2					
Group/ organ	Histopathological findings	Animal code											
		CPPC											
		1	3	4	5	6	7	10	11	12			
Kidney				-	-	-							
	Cast, tubule, multifocal	2	1					2	1				
	Infiltration, mononuclear cell, focal												
Liver			-	-	-	-	-	-	-				
	Infiltration, mononuclear cell, focal	2											

:- No effect.

¹: Degree of lesions was graded from one to five depending on severity: 1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1-25%); 3 = moderate (26-50%); 4 = moderate/severe (51-75%); 5 = severe/high (76-100%).

附錄九、小鼠股骨微電腦斷層掃描分析 3D 組合之結果

